



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ρόλος των φυτοχημικών ενώσεων στην τροποποίηση
της δράσης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων**

**ΙΡΙΝΤΑ Θ. ΔΗΜΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ρόλος των φυτοχημικών ενώσεων στην τροποποίηση
της δράσης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων**

**ΙΡΙΝΤΑ Θ. ΔΗΜΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Δήμα Ίριντας: 26-4-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 697^α/7-12-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καρκαμπούνας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-3-2011

«Ο ρόλος των φυτοχημικών ενώσεων στην τροποποίηση της δράσης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 769^α/7-10-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Καρκαμπούνας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καλφακάκου Βασιλική, Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 786^α/29-3-2016

Ευαγγέλου Άγγελος	Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του

Πέσχος Δημήτριος

Ράγκος Βασίλειος

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική
Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επίκουρος Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-12-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

*Αφιερώνω αυτή τη διδακτορική διατριβή στον
άνθρωπο ο οποίος με έβαλε στο δρόμο της γνώσης
και πού με ώθησε να ξεκινήσω αυτό το ταξίδι,
άλλα που δυστυχώς «έφυγε» νωρίς...*

Στην μνήμη του πατέρα μου...

*«Φάρμακό σας ας γίνει η τροφή σας και
η τροφή σας ας γίνει φάρμακό σας»*

Ιπποκράτης

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή σημαντικών ανθρώπων και συνεργατών, οι οποίοι με στήριξαν και με καθοδήγησαν καθ' όλη τη διάρκεια της.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Σπυρίδων Καρκαμπούνα, ο οποίος με εμπιστεύτηκε από τα φοιτητικά μου χρόνια για την εκπόνηση πτυχιακής εργασίας και έπειτα αναθέτοντας μου αυτή τη διδακτορική διατριβή. Τον ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση και την συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια, και τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις κατά τη συγγραφή της διατριβής. Αισθάνομαι ευγνώμων που είχα την τύχη να συνεργαστώ μαζί του, η αγάπη του για την έρευνα και την επιστήμη αποτελούν παραδείγματα προς μίμηση.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Καθηγήτρια εργαστηρίου Φυσιολογίας κα. Βασιλική Καλφακάκου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την παρακολούθηση της εξέλιξης της παρούσας διατριβής, για το ειλικρινές ενδιαφέρον και την αδιάκοπη συμπαράσταση της, σε επιστημονικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Δημήτριο Πέσχο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, αλλά και για την προετοιμασία και ιστοπαθολογική εξέταση των δειγμάτων από τους επίμυες.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Ομότιμο Καθηγητή εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Άγγελο Ευαγγέλου ο οποίος ήταν πάντα στη διάθεση μου, στηρίζοντας την προσπάθεια μου με πολύτιμες συμβουλές, για την άριστη και εποικοδομητική συνεργασία.

Επίσης ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια εργαστηρίου φυσιολογίας κ. Πατρώνα Βεζυράκη για την αμέριστη βοήθεια της, την εξαιρετική συνεργασία και το συνεχές ενδιαφέρον της προς το πρόσωπο μου. Περισσότερο θα ήθελα να την ευχαριστήσω γιατί αποτελεί ακαδημαϊκό πρότυπο για μένα.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Γναθοπροσωπικής κ. Βασίλειο Ράγκο για την υποστήριξη που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κυρίως τα τελευταία χρόνια της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Μπατιστάτου Άννα για τις συμβουλές της και τη συμμετοχή της στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη φίλη Μαρία Γκιούλη, διδάκτωρ εργαστηρίου Φυσιολογίας για την εκμάθηση τεχνικών και τη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων, τις συμβουλές και την συμπαράσταση μέσα και έξω από το εργαστήριο. Το ζήλος, η ηθική, η αφοσίωση, η αγάπη για την επιστήμη και η δύναμη ψυχής της είναι αξιοθαύμαστα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το φίλο και διδάκτορα φυσιολογίας Παναγιώτη Λέκκα για τη βοήθεια, που μου παρείχε σχετικά με τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους, το οποίο είχε να κάνει με τον χειρισμό πειραματοζώων. Τον ευχαριστώ για την υπομονή και για την προθυμία του να προσφέρει τη βοήθεια του όχι μόνο κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και σε προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Στυλιανό Ζερικιώτη για την πολύτιμη βοήθεια και την άψογη συνεργασία κατά τον χειρισμό των Kit για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η επιστημονική βοήθεια που μου παρείχε, ήταν απαραίτητη για την διεξαγωγή πειραμάτων. Τον ευχαριστώ για τις συμβουλές και την υποστήριξη στο εργαστήριο αλλά και εκτός εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τον Ιωάννη Σίμο, διδάκτορα του εργαστηρίου φυσιολογίας για τη βοήθεια του στα πρώτα βήματα αυτής της διατριβής, για τις τεχνικές που μου δίδαξε, και για τη βοήθεια του στη συγγραφή εργασιών προς δημοσίευση. Όλα αυτά ήταν καθοριστικά για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες του εργαστηρίου Φυσιολογίας Έλενα Γεωργίου, Κονταργύρη Ευάγγελο, Μέτσιο Αποστόλη όπως και του εργαστηρίου Βιολογίας Βραζέλη Παρασκευή και Κασιούμη Παναγιώτα για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, για τις συμβουλές, τις συζητήσεις, την παρέα.

Ευχαριστώ ειδικά την Χριστιάννα Ζαχαρίου και την Χριστίνα Τζήμα για της συμβουλές τους όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας, μέλη ΔΕΠ, προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, τις γραμματείς και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια τους γονείς μου Θωμά και Μαριάννα και την αδερφή μου Ροδαλία για την υποστήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή	7
1.1.1 Φυτοχημικά και αντιοξειδωτικό στρες.....	8
1.1.2 Φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικά	21
1.1.3 Φαινολικές ενώσεις	24
1.2 Φλαβονοειδή	26
1.2.1 Φαρμακολογία των φλαβονοειδών.....	28
1.2.2 Τα φλαβονοειδή ως αντιοξειδωτικά	29
1.2.3 Μηχανισμός των φλαβονοειδών ως αντιοξειδωτικά.....	30
1.2.4 Τα φλαβονοειδή στην θεραπεία του καρκίνου. Μηχανισμοί δράσης.....	31
1.2.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού	32
1.2.6 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου	34
1.2.7 Επαγωγή της απόπτωσης	35
1.2.8 Προώθηση της διαφοροποίησης	36
1.3 Κουερσετίνη	37
1.3.1 Ο κυτταρικός κύκλος ως πιθανός στόχος.....	38
1.3.2 Η προ-αποπτωτική δράση της κουερσετίνης.....	39
1.3.3 Τα φυσιολογικά κύτταρα συνεχίζουν να συμπεριφέρονται ως φυσιολογικά.....	41
1.3.4 Τροποίηση μεταγωγής σήματος.....	41
1.3.5 Η κουερσετίνη και η αναστολή των πρωτεϊνών συνοδών	42
1.4 Επιγαλοκατεχίνη	43
1.4.1 Επαγωγή της απόπτωσης και διακοπή του κυτταρικού κύκλου από την EGCG	43
1.4.2 Διαμόρφωση της κυτταρικής σηματοδότησης από EGCG	44
1.4.3 Αναστολή της MAPK και του ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1	45
1.4.4 Αναστολή του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα του μεσολαβητή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος	45
1.4.5 Αναστολή της υπερέκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2	46
1.4.6 Διαμόρφωση της κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τη μετάσταση και τη μετανάστευση από την EGCG	46
1.4.6.1 Αναστολή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα.....	46
1.4.6.2 Αναστολή μεταλλοπρωτεϊνάσης μήτρας.....	47
1.5 Ρουτίνη	47
1.5.1 Η αντιφλεγμονώδη δράση της ρουτίνης.....	48
1.5.2 Ιατρικές ιδιότητες της ρουτίνης	50
1.5.3 Αντικαρκινική δράση της ρουτίνης	51
1.6 Ναρινγίνη	51
1.6.1 Θεραπευτικές ιδιότητες της Ναρινγίνης	53
1.6.2 Δράση της Ναρινγίνης στον καρκίνο.....	54
1.7 Μη φλαβονοειδοί πολυφαινόλες	56
1.8 Ρεσβερατρόλη	56
1.8.1 Αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης	57
1.8.2 Η ρεσβερατρόλη ευαισθητοποιεί την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων	59

1.8.3 Ενίσχυση της δράσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας από την ρεσβερατρόλη	59
1.9 Γαλλικό Οξύ	60
1.9.1 Μοριακοί στόχοι του γαλλικού οξέος	61
1.9.1.1 Ενεργοποίηση της ATM κινάσης	61
1.9.1.2 Αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης	61
1.9.1.3 Αναστολή της κυκλοοξυγενάσης	62
1.9.1.4 Μείωση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH)	62
1.9.1.5 Επαγωγή της απόπτωσης	63
1.9.1.6 Δράση κατά της αγγειογένεσης	64
1.10 Κουρκουμίνη	65
1.10.1 Αντιοξειδωτική δράση	66
1.10.2 Αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης	67
1.11 Σισπλατίνη	71
1.11.1 Ιστορική αναδρομή	71
1.11.2 Σισπλατίνη στη βοηθητική θεραπεία του καρκίνου και παρενέργειες	71
1.11.3 Κυτταρική δραστηριότητα των ενώσεων σισπλατίνης	74
1.11.3.1 Ενεργές μορφές οξυγόνου	75
1.11.3.2 Αλληλεπίδραση με το DNA. Βλάβη DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσης	76
1.11.3.3 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου	78
1.11.4 Η ανθεκτικότητα στην σισπλατίνη και η p53	80
1.11.4.1 Ενεργοποίηση της p53 και το μονοπάτι MAPK (mitogen- activated protein kinase)	82
1.11.4.2 Επαγωγή της απόπτωσης	83
1.11.4.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	85
1.11.5 Δράση αντιοξειδωτικών ουσιών κατά της τοξικότητας τις σισπλατίνης	86
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	91
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	93
2.1 <i>in vitro</i> Μελέτη	95
2.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια στην <i>in vitro</i> μελέτη	95
2.1.2. Φυτοχημικές ουσίες και χημειοθεραπευτικά	96
2.1.3. Κυτταρικές σειρές	96
2.1.3.1. Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (LMS)	96
2.1.3.2 Καρκινική κυτταρική σειρά του πνεύμονα (H1299)	97
2.1.3.3. Φυσιολογική σειρά ινοβλαστών (MRC-5)	98
2.1.4 Καλλιέργεια κυττάρων	98
2.1.4.1. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	99
2.1.4.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων	90
2.1.5. Έλεγχος της βιωσιμότητας κυττάρων με την μέθοδο του MTT (MTT assay)	100
2.1.6. Προσδιορισμός μηχανισμού πρόκλησης κυτταρικού θανάτου (Απόπτωση-Νέκρωση)	103
2.1.7 Χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπύδιο (PI) και αννεξίνη (Annexin)	104
2.1.8. Ανάλυση Κυτταρικού κύκλου (Cell cycle)	106
2.1.9 Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς (Colony efficiency)	108
2.1.10 Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης	109

2.2. <i>in vivo</i> Πειράματα.....	110
2.2.1. Υλικά και αντιδραστήρια στην <i>In vivo</i> μελέτη.....	110
2.2.2. Σχεδιασμός πειράματος για την <i>in vivo</i> μελέτη	110
2.2.3. Μέτρηση οξείδωσης λιπιδίων.....	116
2.2.4. Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων	117
2.2.4.1 Δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD).....	117
2.2.4.2 Υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).....	118
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	121
3.1 <i>In Vitro</i> Αποτελέσματα	123
3.1.1 Αποτελέσματα επιβίωσης κυτταρικής σειράς LMS.....	123
3.1.2 Αποτελέσματα επιβίωσης κυτταρικής σειράς H1299.....	129
3.1.3 Επίδραση φυτοχημικών ουσιών στην δράση της σισπλατίνης.....	135
3.1.4 Αποτελέσματα επιβίωσης της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλάστες.....	142
3.1.5 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής (απόπτωση- νέκρωση)	150
3.1.6 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.....	155
3.1.7 Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων σε χαμηλή πυκνότητα σποράς	157
3.1.8 Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης.....	159
3.2 <i>In vivo</i> Αποτελέσματα.....	163
3.2.1 Μέτρηση επιπέδων μαλονικής διαλδεϋδης (MDA).....	163
3.2.2 Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων στο πλάσμα πειραματοζώων	166
3.2.2.1 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)	166
3.2.2.2 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	169
3.2.3 Αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων και διατροφικών και μεταβολικών δεικτών επίμυων μετά από χορήγηση σισπλατίνης και κουρκουμίνης.....	173
3.2.4 Αποτελέσματα παθολογοανατομικής μελέτης	186
3.2.5 Στατιστική ανάλυση.....	189
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	191
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	209
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	213
7. ABSTRACT	221
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	227

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι νεοπλασματικές νόσοι – που γενικά χαρακτηρίζονται με τον όρο καρκίνος – αποτελούν ένα σύνολο παθολογιών οι οποίες βρίσκονται συνεχώς σε παγκόσμια αύξηση – εξαιρουμένων ελαχίστων μορφών (π.χ καρκίνος του στομάχου), συνδεδεμένες επιδημιολογικά με πολλές παραμέτρους, μέσα στις οποίες εντάσσεται η αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ανθρώπων, η ισχυρή αστικοποίηση και βιομηχανοποίηση των κοινωνιών, όπως επίσης οι ολοένα επιδεινούμενες ανθρωπογενείς αλλοιώσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών και οι βαθιές μεταβολές του τρόπου ζωής. Παρόλο που δεν υπάρχει μέχρι στιγμής κανένα γενικής δράσης φάρμακο ή εμβόλιο που να μπορεί να εξαφανίσει με πλήρη επιτυχία και ολοκληρωτικά τον καρκίνο, σε οποιοδήποτε νοσεί από την ασθένεια αυτή, κάποιες μορφές τις αρρώστιας μπορεί να αποφευχθούν ή και να αντιμετωπιστούν ενδεχομένως ριζικά. Ο κίνδυνος του καρκίνου μπορεί να μειωθεί με την εξάλειψη αναγνωρισμένων καρκινογόνων ή την μείωση της έκθεσης σε αυτά. Επιπλέον, η αποφυγή κάποιων επικίνδυνων παραγόντων, μπορεί να απαιτήσει μεγάλες αλλαγές στον τρόπο ζωής, οι οποίες δεν είναι εύκολο να εφαρμοστούν. Έχει αναφερθεί ότι 10-70% της ανθρώπινης θνησιμότητας από καρκίνο οφείλεται σε αίτια συνδεδεμένα με την διατροφή (1) και η παρατήρηση αυτή βασίζεται σε πλήθος στατιστικών και επιδημιολογικών δεδομένων. Ένα ευρύ φάσμα ουσιών, που προέρχονται από τη διατροφή έχει βρεθεί ότι επάγουν την ανάπτυξη και την μετάσταση των όγκων σε πειραματόζωα, ενώ μετατρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα σε κακοήγη. Οι ουσίες αυτές ενοχοποιούνται ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Η καρκινογένεση έχει δειχθεί ότι είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε τρία διακριτά στάδια που ονομάζονται έναρξη, προαγωγή και προώθηση. Σε αντίθεση με την έναρξη, η προώθηση του καρκίνου θεωρείται μια μακρά, αλλά και αναστρέψιμη διαδικασία, στην οποία ενεργά πολλαπλασιαζόμενα προ-νεοπλασματικά κύτταρα συσσωρεύονται. Η εξέλιξη του τελικού σταδίου της νεοπλασματικής μετατροπής συμπεριλαμβάνει την αύξηση του όγκου με δυνατότητες εισβολής (διήθησης) στους ιστούς, εισόδου στα αγγεία και μετάστασης σε απόσταση από την πρωτοπαθή εστία. Τα τελευταία σαράντα χρόνια έχουν βρεθεί πολλές ουσίες οι οποίες είναι σε θέση να επηρεάσουν δραστικά όλα

τα στάδια της καρκινικής εξαλλαγής. Οι ουσίες αυτές είναι πολλών τύπων είτε φυσικές είτε συνθετικές (2).

Οι χημειοπροληπτικές ουσίες χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: 1^{ov}) σε παράγοντες αποκλεισμού και 2^{ov}) σε παράγοντες καταστολής. Οι παράγοντες αποκλεισμού αποτρέπουν τα καρκινογόνα να φτάνουν στις περιοχές στόχους, από την μεταβολική ενεργοποίηση και από την αλληλεπίδραση με κυτταρικά μακρομόρια (π.χ DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι παράγοντες καταστολής αναστέλλουν την μετατροπή σε κακοήγη των αρχικών κυττάρων, στο στάδιο της προώθησης και της εξέλιξης (3) . Υπάρχουν πολλές ουσίες, τόσο φυσικής, όσο και συνθετικής προέλευσης που είναι σε θέση να ανακόψουν την δράση των χημικών (καρκινογόνων, αλλά και να αλλάξουν την αντίδραση του οργανισμού στην κακοήγη νόσο (3-19) Τα φυτοχημικά μπορεί να μπλοκάρουν ή να αναστρέψουν την προ-κακοήγη φάση (την έναρξη και την προώθηση) της καρκινογένεσης (3-19).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι μια δίαιτα, πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, όπως και σπόρους ολικής αλέσεως, συνδέεται στενά με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις, τα οποία είναι οι δυο κύριοι λόγοι θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες και στις βιομηχανικές χώρες (20-22). Εκτιμάται ότι το ένα τρίτο των θανάτων από καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες μπορεί να αποφεύγεται με την κατάλληλη τροποποίηση της διατροφής (20-23) . Το 1982 η Εθνική Ακαδημία Επιστημών των Ηνωμένων Πολιτειών συμπεριλάμβανε οδηγίες για την διατροφή και τον καρκίνο, υπογραμμίζοντας την σημασία των φρούτων και λαχανικών (24). Έχει τονιστεί ιδιαίτερα η αξία της προσθήκης εσπεριδοειδών, φρούτων πλούσιων σε καροτένια, λαχανικά και τα σταυρανθή λαχανικά, στην δίαιτα για την μείωση του κινδύνου από καρκίνο. Το 1989, μια αναφορά από την Εθνική Ακαδημία Επιστημών στην διατροφή και την υγεία, συνιστά την κατανάλωση πέντε ή και παραπάνω μερίδων σε φρούτα και λαχανικά καθημερινά, για την μείωση του κινδύνου από καρκίνο και καρδιακές ασθένειες (24).

1.1.1 Φυτοχημικά και οξειδωτικό στρες

Ως φυτοχημικές ουσίες ή απλώς φυτοχημικά ονομάζουμε όλες τις ουσίες οι οποίες παράγονται από τους μεταβολισμούς των φυτικών ειδών και οι οποίες επίσης

ασκούν βιολογικές δράσεις και σε ζωικά είδη αλλά και των ανθρώπων. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 5000 φυτοχημικά σε φρούτα, λαχανικά, σπόρους αλλά ένα μεγάλο ποσοστό παραμένει ακόμα άγνωστο. Τα φυτοχημικά μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε καρροτενοειδή, φαινολικά, αλκαλοειδή, ενώσεις που περιέχουν άζωτο, οργανοθειούχες ενώσεις. Τα φυτοχημικά, που έχουν μελετηθεί πιο πολύ, είναι οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή.

Τα ανθρώπινα κύτταρα και άλλων οργανισμών είναι συνεχώς εκτεθειμένα σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες, μερικοί από τους οποίους είναι σημαντικοί για τη ζωή με πρώτο και κύριο εκπρόσωπο το οξυγόνο που αποτελεί το κύριο στοιχείο της αερόβιας παραγωγής ενέργειας. Ωστόσο τα φαινόμενα ανώμαλης ή υπερβολικής οξείδωσης εντείνονται από μια μεγάλη γκάμα ουσιών, η προέλευση των οποίων είναι τόσο φυσική όσο και ανθρωπογενής. Οι οξειδωτικοί αυτοί παράγοντες έχουν επαυξηθεί ισχυρά από την ανθρωπογενή ρύπανση των οικοσυστημάτων, κατάσταση η οποία έχει ενταθεί υπερβολικά τα τελευταία τριακόσια χρόνια με ρυθμό εκθετικό. Οι ρυπογόνες ουσίες που απελευθέρωσε η συνολική δραστηριότητα της ανθρωπότητας είναι πλέον παρούσες σε όλα τα οικοσυστήματα και μάλιστα πολλές από αυτές έχουν εισέλθει σε όλες τις τροφικές αλυσίδες και δίκτυα με αποτέλεσμα να φτάνουν με το φαινόμενο της βιομεγέθυνσης στο επίπεδο των τελικών καταναλωτών, όπου ανήκει και το ανθρώπινο είδος (25-30). Αυτοί οι οξειδωτικοί παράγοντες που βρίσκονται στον αέρα, στην τροφή, στο νερό αλληλεπιδρούν με τον μεταβολισμό των κυττάρων και δημιουργούν μεγάλους αριθμούς υψηλών δραστικών μορίων (οργανικών ή ανόργανων) που συνήθως εμπεριέχουν ενεργοποιημένα άτομα ή μόρια οξυγόνου, αλλά και άτομα ή μόρια αλογόνων, όπως επίσης και βαρέων μετάλλων, καταλήγοντας στην υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών πολλών ειδών οι οποίες είναι σε θέση να αντιδράσουν έντονα με όλα τα φυσιολογικά βιομόρια των κυττάρων, αν δεν εξουδετερωθούν από το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημά τους (30-38).

Ειδικά μια ποικιλία οργανικών μορίων όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που αφθονούν στα πετρελαιοειδή όπως επίσης και στα προϊόντα ατελούς καύσης οργανικής ύλης, οι νιτροζαμίνες, οι αρωματικές αμίνες, τα αρωματικά αλογονοπαράγωγα (π.χ τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και οι διοξίνες) όταν εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων ενεργοποιούνται μεταβολικά και προκαλούν καταρράκτες

παραγωγής ελευθέρων ριζών, οι οποίες προσβάλλουν τις μεμβράνες, τις πρωτεΐνες, αλλά και τα πυρηνικά οξέα, δημιουργώντας υπερβολικές μοριακές βλάβες στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου(36-41). Είναι φανερό ότι η είσοδος τέτοιου είδους μορίων στα κύτταρα δημιουργεί μια επιβλητική παραγωγή οξειδωτικών ενεργών μορίων με αποτέλεσμα το φυσιολογικό ισοζύγιο μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών παραγόντων να διαταράσσεται υπέρ των φαινομένων οξείδωσης, με αποτέλεσμα την πρόκληση ποικίλων κυτταρικών βλαβών που είναι σε θέση να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία του κυττάρου, σε πυροδότηση του κυτταρικού θανάτου, σε νεκρωτικά φαινόμενα, ρήξη μεμβρανών των λυσοσωμίων και αυτοπεψία, βλάβη των μιτοχονδρίων και των υπεροξεισωμάτων, αποδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου, θραύση της κυτταρικής περιβάλλουσας μεμβράνης, αλλά επίσης σε μεταλλάξεις του γενετικού υλικού, μέσα στις οποίες περιλαμβάνεται και η λεγόμενη «κακοήθης εξαλλαγή», δηλαδή το πρελούντιο της χημικής καρκινογένεσης. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι τα μέταλλα μετάπτωσης είναι δυνατόν, μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton να προξενήσουν επίσης τέτοιους καταρράκτες γένεσης ελευθέρων ριζών (38, 40-52). Επίσης και οι ραδιενεργές ουσίες, ή η διέλευση φωτονίων πολύ υψηλών συχνοτήτων μέσα από τις δομές των κυττάρων είναι δυνατόν να προκαλέσουν διάσπαση των ορίων του ύδατος και παραγωγή ελευθέρων ριζών (μεταξύ των οποίων και την ισχυρά οξειδωτική ρίζα $\text{OH}\bullet$) οι οποίες δίνουν σε δεύτερο στάδιο τις βλάβες τις οφειλόμενες στην ακτινοβολία (53-55).

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι η παραγωγή των ελευθέρων ριζών διαφόρων ενεργοποιημένων μορίων, δεν είναι κάτι που επιβάλλεται εξωγενώς επί των φυσιολογικών κυττάρων, αλλά αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία, η οποία σχετίζεται με την λειτουργία των υπεροξεισωμάτων όπως επίσης και την λειτουργία των μιτοχονδρίων (48, 49, 51-55). Στα μεν υπεροξεισώματα γίνεται αδρανοποίηση ενεργών μορίων, τα οποία υδροξυλιώνονται και μετατρέπονται σε υδατοδιαλυτά, ώστε να μπορεί να απομακρύνουν από τα κύτταρα μέσω της αποβολής του ύδατος και να παροχετευτούν στο περιβάλλον (48, 49, 51-55). Η κύρια μοριακή διάταξη που πραγματοποιεί αυτές τις υδροξυλιώσεις είναι το κυτόχρωμα P-450, σε όλες της ισοενζυμικές του παραλλαγές. Το ενζυμικό αυτό σύστημα δεν είναι εξειδικευμένο ως προς το υπόστρωμά του, αλλά μπορεί να οξειδώσει μέσω της προσθήκης ριζών υδροξυλίου, έναν πολύ μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων τόσο ενδογενών όσο και

εξωγενών (56). Τα μόρια που οξειδώνονται από τα ισοένζυμα τύπου κυτοχρώματος P-450 ανήκουν σε πολύ διαφορετικές κατηγορίες ουσιών και δεν υπάρχει εξειδίκευση. Συνεπώς τα κυτοχρώματα τύπου P-450 είναι ισχυρά και πολυδύναμα συστήματα ικανά να οξειδώνουν ό,τι πρέπει να εξουδετερωθεί και να μετατραπεί σε υδατοδιαλυτό για να φύγει από το κύτταρο (57). Στα μιτοχόνδρια επίσης η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι απόλυτα φυσιολογική καθόσον σχετίζεται με την αναγωγή του οξυγόνου από τα ηλεκτρόνια που διακινούνται μέσω ιόντων υδριδίου, δηλαδή ιόντων υδρογόνου με αρνητικό φορτίο $-1e$ (58). Η αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου από τέσσερα ανιόντα υδριδίου έχει ως τελικό προϊόν δύο μόρια ύδατος, το οποίο είναι ήπια δραστικό και κρίσιμος διαλύτης για τα έμβια συστήματα. Ωστόσο μέχρι την πλήρη αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου παράγονται τέσσερις μοριακοί ενδιάμεσοι, οι οποίοι είναι πολύ δραστικοί ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν αντιδράσεις με κάθε τύπο μορίου που απαντά φυσιολογικά στο κύτταρο, είτε αυτό είναι ζωικό, είτε φυτικό, ή κύτταρο μύκητα. Φυσικά ανάλογα φαινόμενα συμβαίνουν εκτός από τα ευκαρυωτικά και στα προκαρυωτικά κύτταρα των βακτηρίδων και των κυανικών (59).

Για την καλή λειτουργία του κυττάρου βασικός παράγοντας είναι να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ώστε να διατηρηθούν οι βέλτιστες φυσιολογικές συνθήκες. Η υπερπαραγωγή των οξειδωτικών μορίων προκαλεί ανισορροπία στο οξειδαναγωγικό ισοζύγιο, οδηγώντας σε οξειδωτικό stress, όχι μόνον από ρυπογόνα αίτια αλλά και από την φυσική αντίδραση των κυττάρων τόσο σε οξείες όσο και χρόνιες λοιμώξεις πάσης φύσεως, δηλαδή βακτηριακές, ιικές και μυκητιασικές (60). Επίσης η υπερβολική είσοδος ή παραγωγή αναγωγικών μορίων δεν είναι και αυτή αθώα για το κύτταρο καθόσον αναστέλλει ή επιβραδύνει οξειδώσεις οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για πολλές λειτουργίες του, όπως π.χ η αερόβια παραγωγή ενέργειας (αναγωγικό stress), η λειτουργία των οξειδωτικών ενζύμων της οδού του αραχιδονικού οξέος, των ενζυμικών συστημάτων τύπου κυτοχρώματος P-450 και άλλων.

Το οξειδωτικό stress (καταπόνηση) προκύπτει κατ' αρχάς φυσιολογικά από την βαρεία μυϊκή εργασία, μέσω της διέγερσης της αναπνοής τόσο σε επίπεδο πνευμόνων όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, όπου η μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να ανέλθει και 30 φορές πάνω από τα επίπεδα της ηρεμίας (61). Επίσης το οξειδωτικό stress προκύπτει σαν καθαρή κυτταρική αντίδραση από την απλή ενεργοποίηση των κυττάρων

του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα λεγόμενα επαγγελματικά φαγοκύτταρα (μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα), ή και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκειμένου να γίνει αιμόσταση και να μην υπάρξει αιμορραγία μετά από έναν τραυματισμό (62). Φυσικά η λύση της συνέχειας των ιστών, όπως προκύπτει μέσω ενός τραυματισμού, που καταστρέφει τους ιστούς και τέμνει τα αγγεία, αναγκαστικά εισάγει στο αίμα μεγάλους αριθμούς μικροοργανισμών, οπότε τόσο η ανοσολογική ενεργοποίηση, όσο και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του μηχανισμού της αιμόστασης είναι συνεργικά φαινόμενα που αφ ενός συνδέονται στενά, καθόσον έχουν κοινούς διεγέρτες και κοινή εννοχήστρωση, αφ ετέρου αποσκοπούν στην διατήρηση της ακεραιότητας του οργανισμού, στην αποφυγή απώλειας αίματος και στην ανατομική και λειτουργική περιφρούρηση του εσωτερικού περιβάλλοντος από την είσοδο μικροοργανισμών(63). Φερ' ειπείν, τα λευκοκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor), ο οποίος θρομβώνει μεν τα αιμοπετάλια στο σημείο μιας τομής, αλλά από την άλλη πλευρά ενεργοποιεί και προκαλεί χημειοταξία σε λευκοκύτταρα τόσο των παρακείμενων ιστών, όσο και του περιφερικού αίματος (64). Σε φαινόμενα, όπως η πυρετική αντίδραση και η φλεγμονή, η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι επιθυμητή, αλλά και αναγκαία (65). Εξ άλλου κάθε είδους ενεργοποίηση είτε των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (φλεγμονώδη κύτταρα) είτε των αιμοπεταλίων συνοδεύεται πάντα από το φαινόμενο της λεγόμενης οξειδωτικής έκρηξης ή εκρηκτικής αναπνοής (oxygen burst), η οποία αποτελεί μια πολύ μεγάλη αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου από τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια (66, 67). Η οξειδωτική έκρηξη, ή εκρηκτική αναπνοή, είναι ένα επιβλητικό φαινόμενο υψηλής κατανάλωσης οξυγόνου, που σχετίζεται με την αύξηση των κινήσεων των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων με προεκβολή ψευδοποδίων, τα οποία τίθενται σε ζωνή κίνηση, προκαλώντας την διαρκή μεταβολή του σχήματος των εν λόγω κυττάρων, προκειμένου να εκτελέσουν με ακρίβεια και σωστά τις λειτουργίες τους (68, 69). Η οξειδωτική έκρηξη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και κυρίως των ενεργών φαγοκυττάρων σχετίζεται επίσης με την σκόπιμη παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως ανιόντων υπεροξειδίου του οξυγόνου $O_2^{\bullet-}$, και χλωραμινικών ενώσεων (με ισχυρότατο οξειδωτικό χαρακτήρα), που παράγονται στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων και κατευθύνονται κυρίως στα φαγοσώματα στα οποία έχουν εγκλειστεί ενεργά

μικροοργανισμοί, προκειμένου να εξοντωθούν και να αποσυντεθούν ενδοκυττάρια, ώστε να μην διασκορπιστούν στο εσωτερικό του κυκλοφορικού συστήματος προσβάλλοντας το σύνολο των ιστών (68, 69) .

Ωστόσο είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι από όλες τις κατηγορίες των κυττάρων των ιστών του οργανισμού τα λευκοκύτταρα περιέχουν το υψηλότερο ποσοστό ασκορβικού οξέος, το οποίο ανέρχεται στα 6mM στο κυτταρόπλασμα των λευκοκυττάρων, υποδηλώνοντας την ανάγκη να περιοριστούν τα οξειδωτικά φαινόμενα στο εσωτερικό των φαγοσωμάτων, όπου έχουν οδηγηθεί και περιοριστεί τα φαγοκυτταρωμένα μικρόβια, ώστε να μην επεκταθούν σε όλη την μάζα του ενεργού φαγοκυττάρου (70). Επειδή η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο αιματικό πλάσμα, φυσιολογικώς διατρεφομένων ανθρώπων, είναι του επιπέδου 40–80μM, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση του στο εσωτερικό των λευκοκυττάρων ανέρχεται στα 6mM, αυτό υποδηλώνει ότι η είσοδος του ασκορβικού οξέος επιτυγχάνεται με ενεργό μεταφορά, αν και δεν είναι σαφής ο ακριβής μηχανισμός (71). Πάντως αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του σκορβούτου, στην οποία η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο αίμα βυθίζεται κάτω των 20μM, η ανοσολογική άμυνα του οργανισμού είναι βαρέως κεκαμένη, με αποτέλεσμα την έκταση πολλών λοιμώξεων, εξ αιτίας της ανικανότητας των λευκοκυττάρων να αντέξουν το οξειδωτικό stress που αυτά προκαλούν για την πρόκληση της ενδοκυττάριας μικροβιοκτονίας (71). Δεν γνωρίζουμε το κατά πόσον η μείωση του ασκορβικού οξέος κι άλλων αντιοξειδωτικών είναι σε θέση να επιτρέψουν και την καταστροφή ενδοκυττάρων μικροβιακών παρασίτων, όπως είναι τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης και της λέπρας, το πλασμώδιο της ελονοσίας, καθώς και πολλών ιών, ωστόσο η λήψη ασκορβικού οξέος ή και άλλων αντιοξειδωτικών φαίνεται να προστατεύει τον οργανισμό, αυξάνοντας την αντοχή του τόσο από ιικές, όσο και από άλλες λοιμώξεις, όπως π.χ το κοινό κρυολόγημα, ενώ από την άλλη πλευρά μειώνει αποφασιστικά την διάρκεια της νόσου. Ακόμη είναι σαφές ότι η χορήγηση ασκορβικού οξέος έχει μια δράση βελτίωσης του προσδόκιμου επιβίωσης και της ποιότητας ζωής καρκινοπαθών ασθενών τελικού σταδίου (72).

Το οξειδωτικό stress δεν είναι μια απλή και ανώδυνη κατάσταση για τα κύτταρα, αλλά ένα αίτιο σοβαρής ενδοκυττάριας καταστροφής, στο βαθμό που δεν υπάρχουν αναγωγικοί παράγοντες ικανοί να το αναχαιτίσουν. Είναι αξιόλογο να υπογραμμίσουμε

ότι το οξειδωτικό stress προκαλεί πάντα οξειδωτική βλάβη σε όλα τα βιομόρια των κυττάρων όπως στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στα νουκλεϊνικά οξέα, με αποτέλεσμα να έχουμε βλάβες των οργανιδίων, αλλά και μεταλλάξεις του γενετικού υλικού με συνακόλουθη αύξηση του ποσοστού της κακοήθους εξαλλαγής, αλλά και του εκφυλισμού των κυττάρων, γεγονότα τα οποία αυξάνουν σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου και καρδιαγγειακών νοσημάτων σε συστημικό επίπεδο (24, 73).

Για την πρόληψη ή την επιβράδυνση του οξειδωτικού στρες επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες, ο οργανισμός πρέπει να μειώσει την παραγωγή τους κι αυτό επιτυγχάνεται με μια συγκεκριμένη στρατηγική λειτουργικών συμπεριφορών, μια από τις οποίες είναι η αύξηση των αντιοξειδωτικών ουσιών, είτε μέσω ενδογενούς παραγωγής αυτών, είτε μέσω εισόδου δια της διατροφής, ή και των δύο ταυτόχρονα. Φυσικά η μέση κατάσταση συμπεριλαμβάνει τόσο την παραγωγή, όσο και την διατροφική πρόσληψη αντιοξειδωτικών μορίων. Η παραγωγή μορίων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες θα αναλυθεί παρακάτω. Η διατροφική πρόσληψη είναι ένα μέσον πιο προφανές καθόσον πολλά αντιοξειδωτικά δεν μπορεί να παραχθούν από τον μεταβολισμό μας οπότε αναγκαστικά εισάγονται στον οργανισμό έτοιμα μέσα στην τροφή μας. Η κύρια διατροφική πηγή αντιοξειδωτικών μορίων αντιπροσωπεύεται από τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Έτσι τα φρούτα, τα λαχανικά και οι σπόροι ολικής άλεσης περιέχουν ποικιλία αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως μονοφαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις, θειολικές ουσίες, τοκοφερόλες, βανιλικές ενώσεις, καροτενοειδή, ξανθοφύλες, λιπίδια και εν γένει στερολικές ενώσεις, οι οποίες ενισχύουν την προστασία του κυτταρικού συστήματος από την οξειδωτική καταστροφή και μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών (74-77).

Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων (78, 79) και η οξειδωτική καταστροφή συνδέεται με την δημιουργία όγκου μέσω διάφορων μηχανισμών (5, 80, 81). Το οξειδωτικό στρες επαγόμενο από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί αλλοίωση των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων, τοπική αποσύζευξη των απέναντι βάσεων, που αν δεν διορθωθεί από τα επιδιορθωτικά ένζυμα θα οδηγήσει σε μονή ή διπλή μετάλλαξη βάσεων, αλλοίωση ή απώλεια γενετικής πληροφορίας, θραύση της έλικας του DNA, διασταυρούμενη σύνδεση του DNA ή χρωμοσωμική θραύση και αναδιάταξη (81). Αυτή η οξειδωτική καταστροφή που επάγει τον καρκίνο μπορεί να μειωθεί ή να αποτραπεί μέσω

διατροφής ή φαρμακολογικής συμπλήρωσης με αντιοξειδωτικά και άλλα μόρια τα οποία βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά, ή έχουν κατασκευαστεί συνθετικά με πρότυπα απαντώντα κυρίως στα φυτά (8). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυτοχημικά σε κοινά φρούτα και λαχανικά μπορεί να έχουν συμπληρωματικούς και επικαλυπτόμενους μηχανισμούς δράσης συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής δράσης, την εξάλειψη ελευθέρων ριζών, την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην διαφοροποίηση των κυττάρων, ογκογονιδίων, και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, διαμόρφωση της δραστηριότητας ενζύμων στην αποτοξίνωση, οξείδωση και αναγωγή, ρύθμιση του μεταβολισμού ορμονών, ενεργοποίηση και ισχυροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης αντιβακτηριδιακή και αντι-ϊική δράση (23, 74, 75, 82, 83)

Η υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά της διατροφής μειώνουν τον κίνδυνο για χρόνιες παθήσεις αναπτύχθηκε από επιδημιολογικές μελέτες. Οπότε για τους επιστήμονες είναι σημαντικό ο εντοπισμός των βιοδραστικών ενώσεων, ελπίζοντας να βρουν χρήσιμες ουσίες για την πρόληψη των χρόνιων και οξέων ασθενειών. Υπάρχει πάντα ένα σημαντικό ερώτημα σχετικά με το αν ένας καθαρός φυτοχημικός παράγων είναι το ίδιο ωφέλιμος όταν λαμβάνεται απομονωμένος παρά όταν τον εισάγουμε υπό την μορφή τροφίμου. Αυτός ο προβληματισμός είναι παλιός και έχει να κάνει με μια αυθαίρετη ταύτιση των διατροφικών ουσιών με τα φάρμακα, πράγμα το οποίο εισάγει έννοιες της φαρμακοθεραπευτικής στην φαρμακολογική χρήση διατροφικών παραγόντων. Υπάρχει ένας αριθμός μελετών που δείχνουν ότι μεμονωμένες ουσίες με αντιοξειδωτικές δράσεις ευεργετούν την κατάσταση της υγείας, αλλά και άλλες μελέτες οι οποίες δεν αποδεικνύουν αυτές τις δράσεις ή ακόμη δείχνουν ότι η χορήγηση μεμονωμένων συμπληρωμάτων είναι επιβαρυντική για ανθρώπους, όπως π.χ οι καπνιστές (84). Οι μελέτες αυτές πρέπει να αναθεωρηθούν ως προς τον σχεδιασμό και τον μηχανισμό τον οποίο εστιάζουν, όπως επίσης αν επιχειρούν να αποδώσουν φαρμακολογικά χαρακτηριστικά σε ένα διατροφικό αντιοξειδωτικό πρέπει να επαναληφθούν με την χρήση εκδόχων, και φυσικά να χορηγούν τον υπό μελέτη μεμονωμένο διατροφικό παράγοντα σε επαρκείς δόσεις κι όχι σε δόσεις στις οποίες η χορήγησή του είναι και ανεπαρκής και προβληματική (85). Υπάρχουν μελέτες οι οποίες

δείχνουν ότι η χορήγηση περισσότερων του ενός αντιοξειδωτικών αυξάνει ουσιαστικά και δόσοεξαρτώμενα την αναστολή της χημικής καρκινογένεσης, ενώ μειώνει την αύξηση των κακοήθων όγκων μέσα στον χρόνο (8). Η μεθοδολογία αυτή σύμφωνα με την οποία μελετούμε την δράση της αύξησης του αριθμού και της δόσης αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης φαίνεται να είναι ουσιαστικής σημασίας για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικών με το προσθετικό ή συνεργειακό αποτέλεσμα διατροφικών φυτοχημικών παραγόντων, οι οποίοι μελετώνται ως φαρμακολογικώς ενεργές ουσίες (7, 8). Ωστόσο ένα τρόφιμο με ιδιότητες φαρμακολογικές είναι δύσκολο να μελετηθεί ως φάρμακο καθόσον οι ουσίες που περιέχει είναι πολλές φορές εκατοντάδες ή και χιλιάδες, οπότε αναγκαστικά η έρευνα στρέφεται σε συγκεκριμένες εξ αυτών, οι οποίες λόγω του ότι εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά μέσα στο τρόφιμο (κυρίως συστατικά) ή κατάλληλα χημικά χαρακτηριστικά επιλέγονται ως πιο δόκιμες για να ερμηνεύσουν την φαρμακολογική συμπεριφορά του συγκεκριμένου τροφίμου. Ίσως το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η περίπτωση της χρήσης λεμονιών και εν γένει εσπεριδοειδών για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του σκορβούτου των πληρωμάτων των υπερπόντιων ιστοφόρων σκαφών του Βρετανικού στόλου, η οποία οδήγησε το 1927 στην ανακάλυψη, του ασκορβικού οξέος (βιταμίνης C) ως αντισκορβουτικού παράγοντα από τον Albert Szent - Györgyi. Ο Szent – Györgyi απομόνωσε το ασκορβικό οξύ αρχικά από τα επινεφρίδια, αλλά κατόπιν χρησιμοποίησε ως πηγή απομόνωσης την πάπρικα (86). Έκτοτε έχουν απομονωθεί χιλιάδες φυτοχημικές ενώσεις με πολλές και ποικίλες βιολογικές ιδιότητες φαρμακολογικού χαρακτήρα, αλλά σήμερα υπάρχει ένας σκεπτικισμός απέναντι στην αξία της δράσης των εν λόγω ουσιών όταν χορηγούνται μεμονωμένα. Ο εν λόγω σκεπτικισμός δεν είναι ξεκάθαρα τεκμηριωμένος και τα υπάρχοντα συγκρουόμενα συμπεράσματα διαφόρων μελετών μάλλον πρέπει να αποδοθούν στον διαφορετικό σχεδιασμό τους και λιγότερο στην έλλειψη δράσης μιας ουσίας. Γενικά υπάρχει η τάση να θεωρείται ότι όλα τα θετικά οφέλη υπέρ της υγείας μέσω κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών δεν αναπαρήχθησαν από την μονοθεραπευτική χορήγηση ενός μεμονωμένου παράγοντα ή ενός διατροφικού συμπληρώματος. Πέραν του ότι η άποψη αυτή δεν είναι καλά τεκμηριωμένη, διότι υπάρχουν εργασίες που δεν την στηρίζουν, εν τούτοις είναι φανερό ότι ένα τρόφιμο αποτελεί έναν φυσικό φορέα μιας ουσίας που περιέχεται σ' αυτό και συνεπώς ο

οργανισμός μπορεί να την αξιοποιήσει καλύτερα διότι η ίδια συνεργεί και με άλλα μόρια που περιέχονται στο τρόφιμο. Βέβαια σε μια φαρμακολογική προσέγγιση τα βοηθητικά αυτά μόρια θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως «έκδοχα» αν θεωρούσαμε την συγκεκριμένη ουσία ως φάρμακο. Οπωσδήποτε υπάρχει αναγκαιότητα οι μελέτες να σχεδιάζονται κατά τρόπο που να μην είναι ελειμματικός ή προκατειλημένος, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει κανείς να πειραματίζεται χρησιμοποιώντας ένα φάσμα δόσεων και προφανώς με την χρήση εκδόχων προερχομένων από το τρόφιμο προέλευσης της υπό μελέτη φυτοχημικής ουσίας. Αυτό σημαίνει την χορήγηση και μεγαδόσεων αλλά και άλλων ταυτοχρόνως ουσιών ως επιβοηθητικών της απορρόφησης της υπό μελέτης ουσίας, τουλάχιστον όταν το πείραμα περιλαμβάνει την *per os* λήψη (87-89). Το απομονωμένο καθαρό σκεύασμα είτε χάνει την δραστικότητα του είτε μπορεί να μην συμπεριφερθεί το ίδιο με την ουσία στα ολόκληρα φρούτα. Για παράδειγμα ένας αριθμός διερευνήσεων έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος σχετικά με τον καρκίνο είναι αντιστρόφως συνδεόμενος με την κατανάλωση των πράσινων και κίτρινων λαχανικών και φρούτων. Επειδή το β-καροτένιο είναι άφθονο σε αυτά τα λαχανικά και φρούτα, έχει διερευνηθεί εστιασμένα ως ένας πιθανός παράγοντας πρόληψης του καρκίνου σε ποικιλία μοντέλων καρκινογένεσης αλλά και χορηγούμενο συμπληρωματικά (88, 90, 91). Ωστόσο υπάρχει μια μεγάλη επιδημιολογική έρευνα, διάρκειας μεγαλύτερης των 5 ετών που δείχνει ότι η ημερήσια συμπληρωματική χορήγηση 20 mg β-καροτενίου σε βαρείς καπνιστές δεν μειώνει την καρκινογένεση των πνευμόνων, αλλά απεναντίας η ομάδα που έλαβε συμπληρώματα καροτενίου εμφάνισε κατά 17% μεγαλύτερα ποσοστά νεοπλασματικής νόσου(92). Μια δεύτερη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μαζί συμπληρώματα β-καροτενίου και βιταμίνης Α σε άτομα υψηλού κινδύνου νόσησης από καρκίνο του πνεύμονα (βαρείς καπνιστές και εργάτες εκτεθέντες σε αμίαντο), έδειξε ότι οι δύο ρετινοειδείς αυτές ουσίες δεν προστάτευσαν καθόλου την ομάδα των ανθρώπων που τις λάμβανε αλλά απεναντίας συνδέθηκαν με μια αύξηση κατά 28% της συχνότητας του καρκίνου του πνεύμονα (88).

Από την άλλη πλευρά μια μεγάλη πολυκεντρική μελέτη που έγινε στην Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας έδειξε, μεταξύ των άλλων, ότι η χορήγηση τριών παραγόντων (Σελήνιο, βιταμίνη Ε και β-καροτένιο) είχαν δράση μείωσης της επίπτωσης καρκίνου στην υπό μελέτη πληθυσμιακή ομάδα (93). Είναι αξιόλογο να μνημονεύσουμε την εν λόγω

μελέτη καθόσον λαμβάνει χώρα υπό την αιγίδα του Κινεζικού Κράτους, και την άμεση επίβλεψη του Ινστιτούτου καρκίνου της Κινεζικής Ακαδημίας Ιατρικών Επιστημών, ενώ παρακολουθείτο επίσης από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ. Η παρακολούθηση των συμμετεχόντων γινόταν σε μηνιαία βάση. Το σύνολο των ανθρώπων που έλαβαν μέρος στην μελέτη ήταν 29.584 και η χορήγηση των συμπληρωμάτων έλαβε χώρα από το 1985 έως το 1991. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε επί ενός πληθυσμού ο οποίος παρουσίαζε ένα από τα υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του οισοφάγου και του στομάχου στον κόσμο. Η κύρια αιτία που είχε ενοχοποιηθεί για αυτή την κατάσταση ήταν η αναπόφευκτη επιμόλυνση των δημητριακών (ρύζι) της διατροφής τους από τον μύκητα *Aspergillus flavus*, ο οποίος παράγει τις αφλατοξίνες που αποτελούν τα πλέον ισχυρά καρκινογόνα που προέρχονται από βιολογικούς οργανισμούς. Η μελέτη είχε σκοπό στο να βρεί πρακτικά μέσα ώστε να περιοριστεί η νοσηρότητα από καρκίνο στον εν λόγω πληθυσμό διά της χορήγησης των συγκεκριμένων συμπληρωμάτων. Για την ακρίβεια χορηγήθηκαν τέσσερες διαφορετικοί συνδυασμοί συμπληρωμάτων σε μικρές δόσεις. Οι συνδυασμοί αυτοί ονομαζόταν παράγοντες A, B, C & D και είχαν την εξής σύσταση : Ο παράγων A περιείχε ρετινόλη και ψευδάργυρο, ο παράγων B περιείχε ριβοφλαβίνη και νιασίνη, ο παράγων C περιείχε βιταμίνη C και μολυβδένιο, ενώ ο παράγων D περιείχε σελήνιο, β-καροτένιο και βιταμίνη E. Η δοσολογία των συμπληρωμάτων είχε ως εξής : Βιταμίνη C 120 mgr, ριβοφλαβίνη 3,2 mgr, νιασίνη 40 mgr, τοκοφερόλη 30 mgr, ρετινόλη 5000 I.U (ως παλμιτική ρετινόλη), καροτένιο 15 mgr, σελήνιο 50 μγρ, μολυβδένιο 30 μγρ , ψευδάργυρος 22,5 mgr (ως οξείδιο του ψευδαργύρου). Οι εν λόγω παράγοντες χορηγούντο σε καθημερινή βάση υπό την μορφή δισκίων σε οχτώ διακριτές ομάδες εθελοντών (treatment arms) οι οποίες έφεραν τα αρχικά του συνδυασμού παραγόντων που τους χορηγείτο και ήσαν οι εξής : ABCD, AB, AC, AD, BC, BD, CD και ομάδα placebo.

Το διαγνωστικό υλικό (προσωπικά ιστορικά και καταγραφές, ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα και απεικονιστικές εξετάσεις) υπάρχει για το 85% των νεοπλασμάτων που καταγράφηκαν συστηματικά και ταξινομήθηκαν από μια ομάδα Το υλικό αυτό είναι ανοιχτό και προσβάσιμο σε όποιον διαπιστευμένο ερευνητή επιθυμεί να το μελετήσει. Τα επόμενα δέκα έτη, μετά το πέρας της χορήγησης των παραγόντων, η παρακολούθηση των εθελοντών συνεχίστηκε ανελλιπώς από τους επισκέπτες υγείας και τους μελετητές που πραγματοποιούσαν τις συνεντεύξεις μια φορά ανά μήνα, όπως και κατά το στάδιο

της χορήγησης των συμπληρωμάτων. Τα δεδομένα της εν λόγω μελέτης έχουν εν συντομία ως εξής:

1^{ον}) Η ομάδα εθελοντών η οποία έλαβε τον παράγοντα Α (βιταμίνη Α & Ψευδάργυρο) εμφάνισε μια οριακή αύξηση όλων των αιτιών θανάτου τόσο κατά την πενταετή περίοδο της λήψης του συμπληρώματος ($P=0,035$), όσο και κατά τα υπόλοιπα 10 έτη της παρακολούθησης μετά την παύση της χορήγησης του συμπληρώματος. Η εν λόγω οριακή αύξηση των θανάτων οφείλεται κυρίως σε συμβάματα μη σχετιζόμενα με καρκίνους αλλά σε άλλα αίτια, όπως τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια ($P=0,045$) και άλλες αιτίες θανάτου ($P=0,088$). Η επίπτωση θανάτου από καρκίνους γενικά φαίνεται μειωμένη κατά την δεύτερη περίοδο της παρακολούθησης ($P=0,05$) ενώ από γαστροοισοφαγικούς καρκίνους της περιοχής του καρδιακού στομίου είναι επίσης μειωμένη και κατά την τρίτη περίοδο της παρακολούθησης ($P=0,017$) ενώ τις υπόλοιπες δύο δεν εμφανίζει στατιστική συσχέτιση. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν δεν συσχετίζονται με το φύλλο.

2^{ον}) Στην ομάδα εθελοντών που έλαβε τον παράγοντα Β (ριβοφλαβίνη και νιασίνη) ο ολικός ρυθμός θανάτου δεν συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την λήψη του συμπληρώματος ($P=0,318$) τόσο κατά την διάρκεια των ετών της χορήγησής του, όσο και κατά την διάρκεια των υπολοίπων περιόδων παρακολούθησης μέχρι το 2002. Ωστόσο στην ομάδα αυτή παρατηρούμε μια οριακώς στατιστικώς σημαντική συσχέτιση που δείχνει προστατευτική δράση για όλες τις κακοήθεις νόσους στην δεύτερη περίοδο της παρακολούθησης, δηλαδή μετά την λήξη της περιόδου χορήγησης του συμπληρώματος νιασίνης – ριβοφλαβίνης ($P=0,043$). Επίσης η μακροχρόνια λήψη του συμπληρώματος αυτού δεν φαίνεται να ασκεί κάποιες δράσεις επί του συνόλου της επίπτωσης θανάτου, ούτε σε συσχέτιση με το φύλλο ($P=0,177$), ούτε με την ηλικία ($P=0,109$).

3^{ον}) Στην ομάδα εθελοντών που έλαβαν τον παράγοντα C (βιταμίνη C και μολυβδένιο) δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την συνολική επίπτωση θανάτου ($P=0,177$). Ωστόσο η μακροχρόνια λήψη αυτού του τύπου συμπληρώματος συσχετίζεται καλά με μείωση των θανάτων των οφειλόμενων σε αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια ($P=0,023$). Η δράση αυτή δεν φαίνεται να ισχύει κατά τα έτη της χορήγησης του

συμπληρώματος, αλλά γίνεται σαφής κατά τα επόμενα έτη της παρακολούθησης. Η συνολική επίπτωση των θανάτων από κακοήθεις νεοπλασματικές νόσους δεν επηρεάζεται από την λήψη του συμπληρώματος στατιστικώς σημαντικά για το σύνολο των τύπων καρκίνου, αλλά παρατηρείται μια οριακή μη στατιστικώς σημαντική αύξηση των γαστροοισοφαγικών νεοπλασμάτων ($P=0,052$). Δεν ευρέθηκε συσχέτιση με το φύλο αλλά βρέθηκε ένα σημαντικό στοιχείο καλής στατιστικής συσχέτισης με την ηλικία ($P=0,003$). Δηλαδή διαπιστώθηκε ότι οι εθελοντές που έλαβαν την συμπληρωματική αγωγή και είχαν ηλικία μικρότερη των 55 ετών παρουσίασαν μια στατιστικώς σημαντική προστασία από κάθε αιτιολογίας θάνατο ($P=0,001$). Από την άλλη πλευρά η ομάδα εθελοντών που είχε ηλικίες μεγαλύτερες των 55 ετών δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($P=0,607$). Επίσης παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχέτισεις με την ηλικία στην ομάδα που λάμβανε το συμπλήρωμα σε ό,τι αφορούσε την συνολική επίπτωση των κακοήθων νεοπλασμάτων εμπειρέχομένων και των περιστατικών του γαστροοισοφαγικού καρκίνου. Οι εθελοντές ηλικιών κάτω των 55 ετών δεν επηρεάστηκαν ενώ οι άνω των 55 ετών παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου.

4^{ov}) Ο παράγοντας D (σελίνιο, βιταμίνη E, και Β-καροτένιο) μείωσε την συνολική θνησιμότητα. Η πλειοψηφία του συνολικού αποτελέσματος αποδόθηκε σε μειωμένο κίνδυνο θανάτου από το καρκίνο του γαστρεντερικό και οι αιτίες θανάτου οφείλονται σε άλλες ασθένειες. Η επίδραση του παράγοντα D στη συνολική θνησιμότητα δεν τροποποιείται από το φύλο, αλλά τροποποιείται από την ηλικία της ομάδας ($P = 0,024$). Ως εκ τούτου, το σύνολο επίδρασης του παράγοντα D επί του συνόλου θνησιμότητας οφείλεται σε επιδράσεις σε άτομα ηλικίας κάτω των 55 ετών. Τα αποτελέσματα για τη συνολική θνησιμότητα του καρκίνου, την συνολική θνησιμότητα γαστρικού καρκίνου, και τη θνησιμότητα του καρκίνου του οισοφάγου, όλα δείχνουν ότι οι επιδράσεις του παράγοντα D ήταν κυρίως ή αποκλειστικά σε άτομα ηλικίας κάτω των 55 ετών. Οι αναλογίες κινδύνου για το σύνολο θνησιμότητας του καρκίνου που σχετίζεται με τον παράγοντα D ήταν 0,95, για όλα τα θέματα 0.85, για άτομα ηλικίας κάτω των 55, και 1,02 για τα άτομα 55 ετών και άνω. Η θνησιμότητα από τον καρκίνο του οισοφάγου, η επίδραση από την ηλικία ήταν ακόμη πιο έντονη. Δεν υπήρχε συνολική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα D και της θνησιμότητας από τον καρκίνο του οισοφάγου για όλους τους

παράγοντες, ωστόσο, σε άτομα νεότερα από 55 χρόνων, η θνησιμότητα από καρκίνο του οισοφάγου στον παράγοντα D μειώθηκε, ενώ σε άτομα ηλικίας 55 ετών και άνω, αυξήθηκε.

Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν συσχέτιση μεταξύ παραγόντων A, B, ή Γ και τη συνολική θνησιμότητα, τη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο ή τη θνησιμότητα από καρκίνο του οισοφάγου ή του γαστρεντερικού. Ωστόσο, ο παράγοντας D, που περιλαμβάνει σελήνιο, βιταμίνη E, και το β-καροτένιο, μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη συνολική θνησιμότητα, τη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο ή τη θνησιμότητα από καρκίνο του οισοφάγου.

10 χρόνια μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, η ομάδα που έλαβε τον παράγοντα D παρουσιάζει ακόμα μείωση 5% στη συνολική θνησιμότητα και μείωση κατά 11% στη θνησιμότητα από καρκίνο του γαστρικού. Συνολικά, ένας στους 70 ανθρώπους που πήραν τον παράγοντα D γλίτωσε το θάνατο από όλους τους παράγοντες που το προκαλούν, και ένας στα 227 γλίτωσε το θάνατο από καρκίνο του στομάχου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις που να σχετίζονται με το φύλο. Ο παράγοντας D είχε μια ισχυρή προστατευτική επίδραση σε άτομα ηλικίας άνω των 55 ετών, αλλά σχεδόν καμία επίδραση στα άτομα ηλικίας 55 ετών και άνω. Αυτό το πρότυπο παρατηρήθηκε σταθερά για τη συνολική θνησιμότητα, και τη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο του γαστρικού.

Έχει παρατηρηθεί ότι φυτοχημικά εκχυλίσματα από φρούτα και λαχανικά έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιπολλαπλασιαστική δράση, και ο συνδυασμός φυτοχημικών από φρούτα και λαχανικά έχει προταθεί να είναι υπεύθυνος για την ισχυρή αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση αυτών των τροφών (8, 10, 19, 74, 75). Διαφορετικά είδη και ποικίλα φρούτα, λαχανικά και σπόρια έχουν διαφορετικό φυτοχημικό προφίλ (73-76). Ο συνδυασμός πορτοκαλιών, μήλου, σταφυλιών, βατόμουρων παρουσιάζουν μια συνεργιστική δράση στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μέση αποτελεσματική δόση (EC₅₀) κάθε φρούτου μετά από τον συνδυασμό ήταν 5 φορές μικρότερος από το EC₅₀ του κάθε φρούτου από μόνο του, γεγονός που υποδηλώνει συνεργιστική δράση μετά από τον συνδυασμό 4 φρούτων. Η πρόληψη του καρκίνου επιτυγχάνεται καλύτερα από την κατανάλωση ενός μεγάλου εύρους φρούτων και λαχανικών, παρόλο που μια ομάδα

φρούτων μπορεί να κυριαρχούν για ένα είδος καρκίνου. Για την βελτίωση της διατροφής και της υγείας οι καταναλωτές πρέπει να πάρουν τα αντιοξειδωτικά από φρούτα και λαχανικά και όχι από ακριβά συμπληρώματα διατροφής τα οποία δεν περιέχουν ένα ισορροπημένο συνδυασμό φυτοχημικών. Τα οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών περιλαμβάνουν προληπτική δράση σε άλλες χρόνιες ασθένειες όπως το καταρράκτη, την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, νευροεκφυλιστικών νόσων και τον διαβήτη.

1.1.2 Φυτοχημικά ως αντιοξειδωτικά

Η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων από ασθενείς με καρκίνο εκτιμάται μεταξύ 13%-87% (94-100). Οι ασθενείς μπορεί να λαμβάνουν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα όταν υποβάλλονται στη χημειοθεραπεία, για να ανακουφιστούν από την παράπλευρη δράση της τοξικότητας της χημειοθεραπείας, και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητά της. Ωστόσο, η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων από ασθενείς, που υποβάλλονται στη χημειοθεραπεία, έχει πάρει αρνητικές κριτικές, λόγω των ανησυχιών, ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να παρέμβουν στο μηχανισμό δράσης της χημειοθεραπείας και ακολούθως να μειώσει την αποτελεσματικότητά της (101). Άλλοι υποστηρίζουν ότι τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών είναι χρήσιμα, σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία, επειδή αυτά ενισχύουν την αποτελεσματικότητά της χημειοθεραπείας, καθώς και ανακουφίζουν από τις παράπλευρες τοξικές αντιδράσεις, επιτρέποντας στους ασθενείς να ανεχθούν τη χημειοθεραπεία για την πλήρη διάρκεια της θεραπείας και πιθανότατα σε μεγάλες δόσεις (102, 103). Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς μπορεί να έχουν καλύτερη ανταπόκριση στον όγκο και αυξημένες πιθανότητες για να ζήσουν.

Ένας από τους κύριους μηχανισμούς των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι ο σχηματισμός ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ή ελευθέρων ριζών. Φάρμακα, με μηχανισμούς ελευθέρων ριζών, περιλαμβάνουν αλκυλιωτικούς παράγοντες (μελφαλάν, κυκλοφosphαμίδιο), ανθρακυκλίνες (δοξορουβικίνη, επιρουμπικίνη) παράγωγα της ποδοφυλλίνης (etoposide), σύμπλοκα συντονισμού πλατίνης (cisplatin, carboplatin), βαναδίου καθώς και κασιτέρου (14). Δυστυχώς, η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι πηγή σοβαρών παρενεργειών. Για παράδειγμα, η σισπλατίνη και άλλα τοξικά παράγωγα

της πλατίνας προκαλούν νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα και περιφερειακές νευροπάθειες (104, 105). Η δοξορουβικίνη και άλλες ανθρακυκλίνες, προκαλούν καρδιοτοξικότητα (106). Άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα παράγουν χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, και η βλάβη από ελεύθερες ρίζες πιστεύεται ότι είναι μικρότερης σημασίας στο μηχανισμό δράσης τους. Αυτά τα φάρμακα περιλαμβάνουν τις ταξάνες (paclitaxel, docetaxel), τα αλκαλοειδή της βίνκας (βινκριστίνη, βινμπλαστίνη), αντιμεταβολίτες (π.χ. μεθοτρεξάτη, φθοριοουρακίλη, κυταραβίνη) (107, 108). Παραδείγματα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, που δεν θεωρούνται ότι εξαρτώνται από το μηχανισμό οξείδωσης για την αντικαρκινική τους δράση, περιλαμβάνουν την ασπαραγινάση και την δακτινομυκίνη. Στην προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι χημειοθεραπευτικές ενώσεις, με αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται να κατανοηθεί η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θεραπείας και χρήσης αντιοξειδωτικών. Οι πιο αποτελεσματικές χημειοθεραπευτικές ενώσεις έχουν πολλούς μηχανισμούς δράσης και η σχετική τους ικανότητα να παράγουν ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο δοσοεξαρτώμενη αλλά και εξαρτώμενη από τον εντοπισμό και μεταβολισμό του φαρμάκου μέσα σε συγκεκριμένους ιστούς. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά έχουν πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης, και ανάλογα με τη χρήση τους, έχει επισημανθεί ότι έχουν τη δυνατότητα να συμπεριφερθούν ως οξειδωτικά μόρια. Μερικά αντιοξειδωτικά δρουν σαν “εκκαθαριστές” των ελευθέρων ριζών (free radical scavengers) ή σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδιακής υπεροξείδωσης (μελατονίνη, Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες & τοκοτριενόλες), ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), β-καροτένιο και εν γένει καροτενοειδή και βιταμίνη C), αλλά και ως απαραίτητοι συμπαραγόντες ή υποστρώματα σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, που σχηματίζονται από το συνδυασμό με μία πρωτεΐνη για να σχηματισθούν τελικές ενεργείς πρωτεΐνες του αντιοξειδωτικού συστήματος, όπως π.χ η δισμουτάση του υπεροξειδίου του οξυγόνου (SOD), όπου οι απαραίτητοι συμπαραγόντες είναι ο ψευδάργυρος και ο χαλκός, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που είναι μια σεληνοπρωτεΐνη με απαραίτητους συμπαραγόντες το σελήνιο και την ανηγμένη γλουταθειόνη (Se, GSH). Άλλα αντιοξειδωτικά δρουν σαν χηλικοί υποκαταστάτες μετάλλων (η βιταμίνη C, η GSH, η κυστεΐνη, η EGCG) ή σαν κυτταροπροστατευτικά μόρια ενάντια στην προσβολή των ελευθέρων ριζών (βιταμίνες A, E, C, μελατονίνη, GSH, κυστεΐνη,) ενώ μερικά στοχεύουν

να επιδιορθώσουν το προσβεβλημένο DNA, δρώντας παράλληλα με το ενζυμικό σύστημα της επιδιόρθωσής του (ασκορβικό οξύ, GSH κ.α). Έτσι, η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των επιλεγμένων αντιοξειδωτικών με τα επιλεγμένα χημειοθεραπευτικά, είναι αρκετά δύσκολη όταν χρησιμοποιούνται συστήματα κυττάρων *in vitro*, ενώ ακόμα πιο δύσκολη είναι η ερμηνεία όταν χρησιμοποιούνται πολύπλοκα μοντέλα ζώων με προκληθείσα κακοήγη νόσο. Περαιτέρω, παράλληλα με την αντιοξειδωτική τους δράση, αυτές οι ουσίες μπορεί να επηρεάζουν την φαρμακοκινητική ή φαρμακοδυναμική των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων(107).

Οι ασθενείς με καρκίνο, συχνά, πριν από την έναρξη της θεραπείας έχουν χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών (85), επομένως, η χορήγηση των προαναφερθέντων φαρμάκων επιδεινώνει το οξειδωτικό στρες σε καρκινοπαθείς, όπως δείχνεται από τα επίπεδα της οξείδωσης του DNA και την υπεροξείδωση των λιπιδίων, κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία του καρκίνου(109, 110). Στη θεωρία, τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών κατά τη χορήγηση της χημειοθεραπείας, μπορεί είτε να εμποδίζουν τους κυτταροτοξικούς μηχανισμούς της, καταστέλλοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου, που έχουν παραχθεί από το φάρμακο, ή να βοηθούν στην προστασία υγιών κυττάρων από το πρόσθετο οξειδωτικό στρες, ή την τοξικότητα από την θεραπεία. Εδώ παρουσιάζεται και η ουσία του διλήμματος για ασθενείς με καρκίνο, στη προσπάθεια να κατανοηθεί πότε η αντιοξειδωτική θεραπεία θα αυξήσει την ποιότητα της ζωής τους, προστατεύοντας τους υγιείς ιστούς, ή παρεμβαίνοντας ενδεχομένως στην κλινική έκβαση της ασθένειάς τους. Εναλλακτικά, τα αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να βελτιώσουν τα αποτελέσματα, μέσω αύξησης της ικανότητας των ασθενών να ανέχονται πλήρεις δόσεις του αντινεοπλασματικού με προγραμματισμένες θεραπείες χωρίς διακοπή.

1.1.3 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται φυσικά σε υγιείς ιστούς φυτών και μπορεί να καταταχθούν σε δύο ομάδες, στα φλαβονοειδή και σε μη-φλαβονοειδή. Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται από μία κύρια τάξη δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, είναι φυσικά φυτοχημικά, που προέρχονται, κυρίως, από φαινυλαλανίνη, και λιγότερο συχνά, από τυροσίνη, και βρίσκονται, σε μεγάλο βαθμό, στην τροφή (111-113). Χημικά, οι φαινολικές ενώσεις είναι διαφορετικές στην δομή, αλλά μπορεί να ορίζονται ως ουσίες

που διαθέτουν το λιγότερο έναν αρωματικό δακτύλιο, που φέρει μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου, ή και μεθοξυλικές ρίζες (CH₃O-), όπως στην βανιλίνη και στα παράγωγά της. Σύμφωνα με τον αριθμό των υδροξυλιωμένων αρωματικών δακτυλίων και το είδος της λειτουργικής ομάδας, οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, ή μονοφαινόλες. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών παράγωγων, που συμπεριλαμβάνουν τις απλές φαινόλες, τα φαινυλοπροπανοειδή, βενζοϊκό οξύ, φλαβονοειδή και στιλβένια, έχουν βρεθεί σε φρούτα και λαχανικά. Επιπλέον, πολλές φαινολικές ενώσεις πολυμερίζονται σε μεγάλα μόρια, όπως οι τανίνες, οι λιγνάνες, και οι λιγνίνες. Οι φαινολικές ενώσεις προσέλκυσαν μεγάλη προσοχή λόγω της δυνατής αντιοξειδωτικής δράσης τους. Η πρόσφατη επιστημονική βιβλιογραφία προτείνει ότι οι φαινολικές ενώσεις κατέχουν μια αποτελεσματική ανασταλτική δράση στην εξάπλωση του καρκίνου και στην μετάσταση (10, 114)

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι η χημειοπροστασία ορίζεται ως η χρήση συνθετικών ουσιών, που αποτρέπουν τη δημιουργία του καρκίνου και την εξέλιξη του. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυσικά φυτοχημικά τα οποία είναι παράγωγα των φυτών περιέχουν φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν την δυνατότητα να σταματήσουν την μετάσταση του καρκίνου (115). Αντίστοιχες δράσεις εμφανίζουν επίσης και άλατα όπως το θειϊκό βανάδιο, αλλά και σύμπλοκα αυτού με αντιοξειδωτικά (14). Επίσης απλά μόρια με φαινολικά χαλακτηριστικά, όπως το φαινύλ οξεικό οξύ (antineoplastons) δρουν σε ποικίλες μορφές κακοήθειας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (116)

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από μεγάλη συσσώρευση φυτοχημικών, που αποτελούνται από υποομάδες, που ορίζονται από τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι ομάδες φαινολικών ενώσεων.

Ομάδα φαινολικών	Σκελετός
Απλές φαινόλες	C6
Βενζοϊκά οξέα	C6-C1
Φαινυλοξικά οξέα	C6-C2
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα, Φαιλυλοπροπένια Κουμαρίνες, Χρωμόνες	C6-C3
Ναφθοκινόνες	C6-C4
Φλαβονοειδή: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόνες, ανθοκυάνες, φλαβανόλες, χαλκόνες	C6-C3-C6
Λιγνάνες	(C6-C3)n
Διφλαβονοειδή	(C6-C3-C6)2
Λιγνίνες	(C6-C3)n
Πολυμερή φλαβονοειδή	(C6-C3-C6)n

Πίνακας 1. Ομάδες φαινολικών ενώσεων

1.2 Φλαβονοειδή

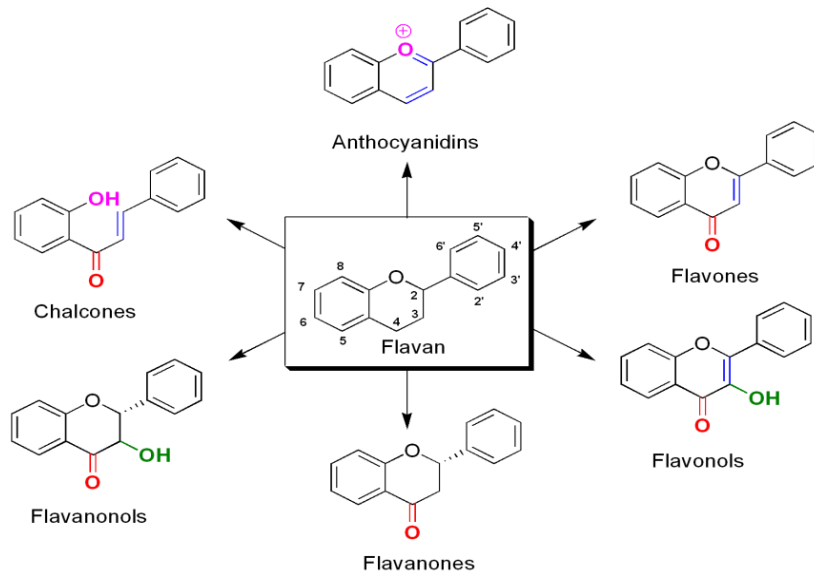
Τα φλαβονοειδή ανήκουν σε μία ομάδα φυσικών ουσιών με διαφορετικές φαινολικές δομές και βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, σπόρους, φλοιούς, ρίζες, λουλούδια, τσάι και κρασί (117). Αυτά τα φυσικά προϊόντα ήταν γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία πολύ πριν απομονωθούν τα φλαβονοειδή ως αποτελεσματικές ενώσεις. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 ποικιλίες φλαβονοειδών, πολλά από τα οποία είναι υπεύθυνα για το ελκυστικό χρώμα των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων (118). Οι έρευνες για τα φλαβονοειδή έλαβαν μια ώθηση με την ανακάλυψη του “Γαλλικού παράδοξου”, όπως και από το χαμηλό επίπεδο θνησιμότητας από καρδιαγγειακά προβλήματα, όπως παρατηρείται στον μεσογειακό πληθυσμό σε σχέση με την υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού και με την υψηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους. Τα φλαβονοειδή στο κόκκινο κρασί είναι υπεύθυνα, τουλάχιστον εν μέρει, για αυτό το αποτέλεσμα (119). Επιπρόσθετα, επιδημιολογικές

μελέτες υποδηλώνουν έναν προστατευτικό ρόλο των φλαβονοειδών κατά της στεφανιαίας νόσου(120). Η σχέση μεταξύ λήψης φλαβονοειδών και μακροπρόθεσμης επίδρασης στη θνησιμότητα, μελετήθηκε στη συνέχεια (121) και προτάθηκε ότι η λήψη φλαβονοειδών συσχετίζεται αντιστρόφως με τη θνησιμότητα από στεφανιαία καρδιακή νόσο (122).

Έχει γίνει ευρέως γνωστό για αιώνες ότι τα παράγωγα των φυτών διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικής δραστηριότητας (123). Το 1930, μία νέα ουσία απομονώθηκε από πορτοκάλια, το οποίο πιστευόταν ότι ήταν μία καινούργια τάξη βιταμινών, και είχε οριστεί ως βιταμίνη Ρ. Όταν έγινε ξεκάθαρο ότι αυτή η ουσία ήταν ένα φλαβονοειδές (η ρουτίνη), ξεκίνησε ένας επαναπροσδιορισμός της έρευνας, στην προσπάθεια να απομονωθούν τα φλαβονοειδή και να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης τους. Τα φλαβονοειδή μπορεί να χωριστούν σε διάφορες τάξεις με βάση τη μοριακή τους δομή (124). Οι κύριες ομάδες των φλαβονοειδών παρατίθενται στον πίνακα 2 μαζί με τα πιο γνωστά μέλη κάθε ομάδας. Η μοριακή δομή κάθε ομάδας φλαβονοειδών δίνεται στην εικόνα 1.

Οι φλαβονόλες χαρακτηρίζονται από μία επίπεδη δομή, εξαιτίας ενός διπλού δεσμού στον κεντρικό αρωματικό δακτύλιο. Ένα από τα πιο γνωστά φλαβονοειδή, η κουερσετίνη, είναι ένα μέλος αυτής της ομάδας. Η κουερσετίνη βρίσκεται σε αφθονία στα κρεμμύδια, στα μήλα, στο μπρόκολο και στα μούρα. Οι δεύτερη ομάδα είναι η φλαβανόνες, που κυρίως τα βρίσκουμε στα εσπεριδοειδή. Ένα παράδειγμα ενός φλαβονοειδούς αυτής της ομάδας, είναι η ναρινγενίνη. Τα φλαβονοειδή, που ανήκουν στις κατεχίνες, βρίσκονται κυρίως στο πράσινο και μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί (125), ενώ οι ανθοκιανίνες βρίσκονται στις φράουλες και στα άλλα μούρα, τα σταφύλια, το κρασί και το τσάι (126).

Μία σημαντική δράση των φλαβονοειδών είναι η δέσμευση ελευθέρων ριζών, που αντλούνται από το οξυγόνο. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, αντιαλλεργική, αντιϊκή και αντικαρκινικές ιδιότητες.



Εικόνα 1: Μοριακή δομή κάθε ομάδας φλαβονοειδών

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ομάδες φλαβονοειδών και οι ουσίες που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα

Φλαβόνες	απιγενίνη, λουτεολίνη
Φλαβονόλες	κερκετίνη, καμφερόλη
Φλαβανόνες	ναρινγκενίνη, εσπεριτίνη
Φλαβανονόλες	ταξιφολίνη
Φλαβανόλες-3 (Κατεχίνες):	κατεχίνη, γαλλοκατεχίνη
Φλαβανοδιόλες-3,4	προκυανιδίνη, προδελφιδίνη, προμαλβιδίνη

Πίνακας 2: Φλαβονοειδή και οι ουσίες για κάθε ομάδα

1.2.1 Φαρμακολογία των φλαβονοειδών

Έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Αυτά περιλαμβάνουν την αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριδιακή, αντιϊκή, αντιαλλεργική (127-129) και αντικαρκινική δράση, τη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών παθήσεων και την αγγειοδιασταλτική δράση(116, 130, 131). Επίσης, είναι γνωστό ότι τα φλαβονοειδή

αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, την συσσώρευση αιμοπεταλίων, τη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων και τη δράση των ενζύμων κυκλοξυγενάση και λιποξυγενάση. Τα φλαβονοειδή έχουν αυτές τις δράσεις ως αντιοξειδωτικά και ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών (117, 129, 131) και επίσης, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν διάφορα ένζυμα όπως τις υδρολάσες, τις υαλουρονιδάσες, την αλκαλική φωσφατάση, την αρυλσουλφατάση, την cAMP φωσφοδιεστεράση, την λιπάση, την α-γλυκοσιδάση και την κινάση (132).

1.2.2 Τα φλαβονοειδή ως αντιοξειδωτικά

Η καλύτερη ιδιότητα, που έχει περιγραφεί καλύτερα για κάθε ομάδα φλαβονοειδών, είναι η ικανότητα τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Οι φλαβόνες και οι κατεχίνες φαίνεται να είναι τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή για την προστασία του οργανισμού από τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Τα κύτταρα και οι ιστοί του οργανισμού απειλούνται συνεχώς από την βλάβη, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και τις ενεργές μορφές οξυγόνου, οι οποίες παράγονται από το μεταβολισμό του οξυγόνου ή από κάποια εξωτερική βλάβη (133, 134). Οι μηχανισμοί και η αλληλουχία των γεγονότων, με τα οποία οι ελεύθερες ρίζες παρεμβαίνουν στην κυτταρική λειτουργία δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, αλλά ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα φαίνεται να είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, που έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η κυτταρική βλάβη προκαλεί μία αλλαγή στο καθαρό φορτίο του κυττάρου, αλλάζοντας την ωσμωτική πίεση, που οδηγεί σε διόγκωση και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσελκύουν διάφορα ενδιάμεσα της φλεγμονής, συμβάλλοντας σε μια γενική φλεγμονώδη απόκριση και βλάβη των ιστών. Για να προστατεύουν τον εαυτό τους από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μερικούς αποτελεσματικούς μηχανισμούς(40). Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής προστασίας του οργανισμού περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (SOD) , την καταλάση (CAT) και το υπεροξειδίο της γλουταθειόνης (GPX), αλλά επίσης μη ενζυματικούς ομολόγους, όπως η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), το β-καροτένιο, η βιταμίνη A, και το NADPH . Η αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου κατά τη

διάρκεια βλάβης, οδηγεί στην κατανάλωση και εξάντληση των ενδογενών ενώσεων δέσμησης. Τα φλαβονοειδή μπορεί να έχουν μία προσθετική δράση στις ενδογενείς ενώσεις δέσμησης. Τα φλαβονοειδή μπορεί να παρεμβαίνουν σε περισσότερα από 3 διαφορετικά συστήματα παραγωγής ελευθέρων ριζών, αλλά μπορούν να αυξήσουν τη λειτουργία ενδογενών αντιοξειδωτικών (135).

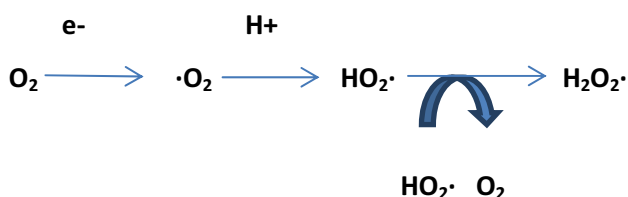
1.2.3 Μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών ως αντιοξειδωτικά

Η δράση των αντιοξειδωτικών ως δεσμευτών των ελευθέρων ριζών οφείλεται στην ικανότητα τους να δώσουν υδρογόνο. Πράγματι, οι φαινολικές ομάδες των φλαβονοειδών χρησιμεύουν ως πηγή άμεσα διαθέσιμων ατόμων "H", έτσι ώστε οι επόμενες ρίζες, που παράγονται, μπορούν να μετατοπιστούν επί της δομής του φλαβονοειδούς (136). Η ικανότητα δέσμησης ελευθέρων ριζών αποδίδεται, κυρίως, στην υψηλή ενεργότητα των υποκατάστατων του υδροξυλίου, που λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση(137).



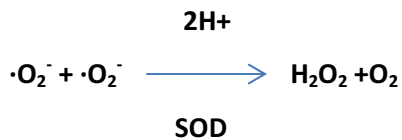
Εικόνα 2: Απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών

Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την υπεροξειδωση λιπιδίων σε ένα πρώιμο στάδιο *in vitro*, δρώντας ως δέκτες του ανιόντος του υπεροξειδίου και των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου. Μπορούν να τερματίσουν την αλυσίδα αντίδρασης των ελευθέρων ριζών, δίνοντας το άτομο του υδρογόνου σε μία ελεύθερη ρίζα υπεροξέος, όπως στην εικόνα 2, σχηματίζοντας έτσι ελεύθερη ρίζα φλαβονοειδούς, η οποία μετά αντιδρά με μία ελεύθερη ρίζα, η οποία τερματίζει το στάδιο της διάδοσης στην υπεροξειδωση λιπιδίων(129, 138).



Εικόνα 3: Δημιουργία της ελεύθερης ρίζας

Φυσικά, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μία προστασία κατά των τοξικών ουσιών, όπως το υπεροξυνιτρώδες και το νιτρώδες οξύ. Ένας σημαντικός μηχανισμός καταλύεται από το ένζυμο του υπεροξειδίου της δισμουτάσης (SOD), το οποίο μετατρέπει δύο ανιόντα υπεροξειδίου σε H₂O₂ και O₂ (139).



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός καταλύομενος από την SOD

1.2.4 Τα φλαβονοειδή στην θεραπεία του καρκίνου. Μηχανισμοί δράσης

Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια που προκαλείται από διαταραχή στο μεταβολισμό της ανάπτυξης (140). Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, αποδιαφοροποίηση και απώλεια της λειτουργίας, εισβολή και μετάσταση, που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, τα φλαβονοειδή ήταν μέρος της θεραπείας με βότανα, όμως, πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν ως δραστικές ουσίες. Παραδείγμα φυτικού παρασκευάσματος, στο οποίο οφείλουν την αυξανόμενη αναγνώριση τους ως αντικαρκινικών φαρμάκων τα φλαβονοειδή, είναι η πρόπολη(139).

Τα φλαβονοειδή είναι ισχυρά βιοδραστικά μόρια, που έχουν αντικαρκινική δράση, αφού παρεμβαίνουν στην αρχή, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου, με την διαφοροποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την μετάσταση (141).

Τα φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ως δυνατοί χημειοπροληπτικοί υποψήφιοι για τη θεραπεία του καρκίνου, λόγω της ικανότητάς τους να επάγουν την απόπτωση (141) . Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί δεσμευτές των περισσότερων τύπων οξειδωτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων του μονήρους οξυγόνου και διαφόρων ελευθέρων ριζών, τα οποία, πιθανώς, να συμπεριλαμβάνονται στη βλάβη του DNA και στην εξέλιξη του όγκου. Τα φλαβονοειδή μπορεί να έχουν ευεργετική δράση, μέσω της επίδρασής τους στην βιοενεργοποίηση της καρκινογένεσης.

Πολλά χημικά καρκινογόνα χρειάζονται τη μετατροπή από τη φάση I του μεταβολισμού των ενζύμων σε μια πιο ενεργή μορφή, ικανή να δεσμεύεται στο DNA. Εάν η μετάλλαξη που θα προκύψει δεν διορθώνεται, μπορεί να ξεκινήσει την προώθηση της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Η δραστική χημική ομάδα που αναφέρθηκε στη φάση I του ενζύμου (ή το αρχικό καρκινογόνο) μπορεί να αποτοξινωθεί μέσω της σύνθεσης, κατά τη φάση II, με τα ένζυμα μεταβολισμού σε μια χημική ένωση, διαλυτή στο νερό, η οποία, μετά, μπορεί να αποβάλλεται από τον οργανισμό. Οι φλαβονόνες κουερσετίνη, καμφερόλη και γκαλανγίνη (galangin), καθώς και η φλαβόνη απιγενίνη, έχουν δείξει να αναστέλλουν το κυτόχρωμα P450 και ένζυμα της οικογένειας CYP1A (142-145). Αυτά τα ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενός αριθμού ύποπτων ανθρώπινων καρκινογόνων, όπως οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και ετεροκυκλικές αμίνες. Η κουερσετίνη και η ναρινγενίνη έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την CYP3A4 και να συμβάλλουν στην κατασταλτική δράση του χυμού του γκρέιπφρουτ σε αυτό το ένζυμο(145). Η CYP3A4 είναι η πιο άφθονη από τα ένζυμα P450 στο συκώτι και μεταβολίζει ένα σημαντικό αριθμό καρκινογόνων και φαρμάκων.

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι η επαγωγή των μεταβολικών ενζύμων τις φάσης II, όπως η γλουταθειόνη, η S-τρανσφεράση, η αναγωγάσης κινόνης και η UDP-γλυκουρόν τρανσφεράσης(146, 147), από τις οποίες τα καρκινογόνα αποτοξινώνονται και αποβάλλονται από το σώμα. Αυτό εξηγεί την χημειοπροληπτική δράση των φλαβονοειδών κατά την καρκινογένεση.

In vivo και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες του τσαγιού αυξάνουν την ενεργότητα μερικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενζύμων αποτοξίνωσης όπως η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-αναγωγάση της γλουταθειόνης και η καταλάση(148, 149).

1.2.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού

Ένας μη ρυθμιζόμενος πολλαπλασιασμός φαίνεται να είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της νεοπλασίας. Η πρόληψη του καρκίνου, γενικά, συνδέεται με την αναστολή, την αναστροφή ή την επιβράδυνση του κυτταρικού υπερπολλαπλασιασμού. Πολλά φλαβονοειδή έχουν αποδείξει ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό σε πολλές

ανθρώπινες καρκινικές σειρές, ενώ είναι λιγότερο ή καθόλου τοξικά σε φυσιολογικά κύτταρα (150-154).

Γενικά, πιστεύεται ότι ο σχηματισμός των ενεργών μορφών οξυγόνου ROS, είναι ένας “καταλύτης” στην προώθηση του καρκίνου και των σταδίων εξέλιξης. Τα προοξειδωτικά ένζυμα, επαγόμενα ή ενεργοποιημένα από διαφορετικούς προαγωγούς του όγκου, όπως για παράδειγμα οι εστέρες φορβόλης, περιλαμβάνουν ένζυμα μεταβολισμού τις κυκλοξυγενάσες (COX), και τις λιποξυγενάσες (LOX). Τα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικά στο να αναστέλλουν την οξειδάση της ξανθίνης (155) την COX και την LOX (156-158) και ως αποτέλεσμα, αναστέλλουν των πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου. Για παράδειγμα, φλαβονοειδή, όπως η κουερσετίνη, η απιγενίνη, και κατεχίνες του τσαγιού έχουν δείξει και αντιφλεγμονώδη δράση, αναστέλλοντας την κυκλοξυγενάση-2 (COX2) και επάγοντας τη συνθάση του νιτρικού οξειδίου (157, 159). Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία ενός αριθμού καρκίνων και οι αναστολείς της COX-2 μελετώνται ως χημειοπροληπτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Επιπρόσθετα, η αναστολή της βιοσύνθεσης πολυαμινών, μπορεί να είναι ένας μηχανισμός αναστολής του πολλαπλασιασμού από τα φλαβονοειδή. Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης είναι ένα ένζυμο περιορισμού του ρυθμού βιοσύνθεσης των πολυαμινών, η οποία έχει συσχετιστεί με τον ρυθμό σύνθεσης του DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε μερικούς ιστούς. Πειράματα έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή μπορεί να αναστέλλουν την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, που προκαλεί προαγωγή του όγκου, οπότε γίνεται μια ελάττωση πολυαμινών και αναστολή του DNA/ σύνθεσης πρωτεϊνών (160). Επίσης από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι ορισμένες πολυαμίνες, όπως και εν γένει αμίνες είναι σε θέση να ελαττώσουν δραστικά την καρκινογόνο δράση σημαντικών καρκινογόνων παραγόντων, όπως το 3,4- βενζοπυρένιο (4, 5).

Τα φλαβονοειδή είναι, επίσης, αποτελεσματικά στο να αναστέλλουν τα ένζυμα μεταγωγής σήματος, όπως για παράδειγμα την πρωτεϊνική τυροσινική κινάση (PTK) (158, 161) και την πρωτεϊνική κινάση C (PTC), τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Μερικά φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ως αναστολείς της αρωματάσης (150, 162, 163). Ουσιαστικές αποδείξεις υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα οιστρογόνα συμμετέχουν στον καρκίνο του μαστού. Η οιστραδιόλη, το πιο ισχυρό

ενδογενές οιστρογόνο, βιοσυντίθεται από ανδρογόνα από το ένζυμο κυτόχρωμα P450, που ονομάζεται αρωματάση. Η αναστολή της αρωματάσης είναι μια σημαντική προσέγγιση για τη μείωση της ανάπτυξης διεγερτικής επίδρασης των οιστρογόνων σε εξαρτώμενους από ορμόνες καρκίνους π.χ. του μαστού. Σε καρκινικά κύτταρα, που εξαρτώνται από το οιστρογόνο σε μοντέλα ζώων, αυτό το αποτέλεσμα αναστολής πολλαπλασιασμού έχει σχέση με τις μη οιστρογονικές ιδιότητες των φλαβονοειδών (π.χ. ισοφλαβονοειδή, κουερσετίνη)(164).

1.2.6 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου

Η διατάραξη του κυτταρικού κύκλου μπορεί να ευθύνεται για την αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών. Μιτογόνα σήματα, δεσμεύουν τα κύτταρα για την είσοδο σε μια σειρά από βήματα, επιτρέποντας στο να διασχίσουν τον κυτταρικό κύκλο. Η σύνθεση του DNA (S φάση) και ο διαχωρισμός των δύο θυγατρικών κυττάρων (M φάση), είναι τα κύρια χαρακτηριστικά για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ο χρόνος, μεταξύ της S και M, είναι γνωστός ως φάση G2. Αυτή η φάση είναι σημαντική γιατί επιτρέπει στα κύτταρα να διορθώσουν λάθη, που συμβαίνουν κατά το διπλασιασμό του DNA, αποτρέποντας την διάδοση αυτών των σφαλμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Σε αντίθεση, η φάση G1 αντιπροσωπεύει την περίοδο αυτή του κυτταρικού κύκλου, που διαχωρίζει τη φάση M και S, έως ότου τα κύτταρα ετοιμάζονται για το διπλασιασμό του DNA μετά από τα μιτογόνα σήματα.

Οι CDKs (Cyclin- dependent kinases) έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί ρυθμιστές για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η αλλαγή και η απορρύθμιση της δραστηριότητας της CDK είναι χαρακτηριστικά της νεοπλασίας. Ένας αριθμός των όγκων σχετίζεται με την υπερ-ενεργοποίηση των CDKs, ως αποτέλεσμα μετάλλαξης του γονιδίου CDK ή του αναστολέα του CDK γονιδίου. Ως εκ τούτου, αναστολείς ή ρυθμιστές, έχουν ενδιαφέρον να μελετηθούν ως νέοι θεραπευτικοί παράγοντες στον καρκίνο (165, 166)

Έχει βρεθεί ότι τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1/S και G2/M σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, διαταράσσονται από φλαβονοειδή όπως η σιλυμαρίνη, η γενιστεΐνη, η κουερσετίνη, η λουτεολίνη, η καεμφερόλη, η απιγενίνη και η επιγαλλοκατεχίνη (167-169). Επίσης, φλαβονοειδή του τσαγιού αναστέλλουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και τους

αυξητικούς παράγοντες, που προέρχονται από αιμοπετάλια, που επηρεάζουν ευνοϊκά τα μετέπειτα γεγονότα, όπως η αγγειογένεση (170). Η γενιστεΐνη και η κουερσεΐνη αναστέλλουν τη πρωτεΐνη τυροσινική κινάση, η οποία περιλαμβάνεται στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (171, 172). Τελικά η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η κουερσεΐνη έχουν δείξει να προκαλούν αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την p53 (173).

1.2.7 Επαγωγή της απόπτωσης

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες, που παρατηρούνται στα φλαβονοειδή, μπορεί να οφείλονται στην απόπτωση (151, 152, 156, 174-177). Η απόπτωση είναι μία ενεργή μορφή κυτταρικού θανάτου, που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την επιβίωση, με την εξάλειψη κατεστραμένων ή ανεπιθύμητων κυττάρων. Ρυθμίζεται αυστηρά από ένα σύνολο γονιδίων, που είτε προάγουν την απόπτωση είτε προάγουν την επιβίωση των κυττάρων, και διαμεσολαβείται μέσω ενός εξαιρετικά οργανωμένου δικτύου αλληλεπιδράσεων πρωτεασών και των αναστολών τους, σε απόκριση σε επιβλαβή ερεθίσματα είτε εντός είτε εκτός του κυττάρου. Απορύθμιση της απόπτωσης μπορεί να παίζει ένα κρίσιμο ρόλο στην ογκογένεση. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι, σχεδόν όλες οι χημειοθεραπευτικές ουσίες ασκούν τη δράση τους στην αναστολή του όγκου μέσω της επαγωγής της απόπτωσης στα κύτταρα στόχους και ιστούς.

Τα φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση σε μερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι μοριακοί μηχανισμοί, με τους οποίους τα φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση, δεν έχουν διευκρινιστεί. Διάφοροι μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται, που περιλαμβάνουν την αναστολή του DNA, τη δραστηριότητα της τοποισομεράσης I/II (158, 176, 178, 179), τη μείωση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (180), τη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (181), τη διαμόρφωση των μονοπατιών σηματοδότησης (175), την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τη μετέπειτα ενεργοποίηση της κασπάσης -9 και της κασπάσης-3 (176), τη μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης των Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) και Bcl-X (L) αλλά και την προώθηση της έκφρασης

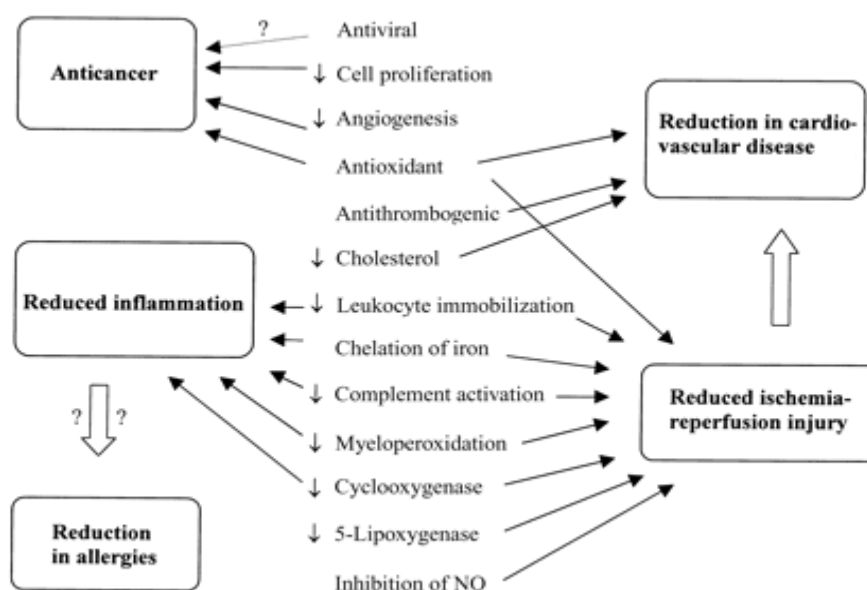
των Bax, Bak και του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), την ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης, καθώς

και την καταστολή της πρωτεΐνης Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein) (151, 156, 180, 182).

1.2.8 Προώθηση της διαφοροποίησης

Εκτός από τις αντικαρκινικές ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει ενδιαφέρον ότι κάποια флаβονοειδή προκαλούν σε αδιαφοροποίητες κυτταρικές σειρές τη διαφοροποίηση σε κύτταρα, εμφανίζοντα ώριμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (183, 184). Οι флаβόνες γενιστεΐνη, απιγενίνη, λουτεολίν και κουερσετίνη έχουν βρεθεί να επάγουν τη διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς HL-60, οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, σε κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα(185). Η διαφοροποίηση ερυθροειδών της ανθρώπινης μυελογενούς λευχαιμίας κυτταρικής σειράς K562 και μιας ανθεκτικής σε πολλά φάρμακα υποομάδας (K562R), μπορεί να επάγεται από τη γενιστεΐνη(186, 187). Επιπλέον, οι флаβόνες έχουν δείξει να επάγουν την διαφοροποίηση στα HT-29 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του εντέρου (151).

Οι καρκίνοι προκύπτουν από κύτταρα, που φέρουν μεταλλάξεις και που δεν έχουν την ανάγκη για εξωγενείς παράγοντες ανάπτυξης. Απορρύθμιση του ελέγχου της αύξησης οδηγεί σε κλωνικές σειρές κυττάρων, που πολλαπλασιάζονται με εμβρυϊκό ρυθμό και αποτυγχάνουν να ανταποκριθούν στη διαφοροποίηση και σε σήματα ωρίμανσης. Ως νέα θεραπεία κατά του καρκίνου και για την πρόληψη του, έχουν χρησιμοποιηθεί μη φυσιολογικοί επαγωγείς για την τελική διαφοροποίηση. Η επαγωγή της τελικής διαφοροποίησης από флаβονοειδή, μπορεί να οδηγήσει στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων και την επανεξισορρόπηση της κανονικής ομοιόστασης του κυττάρου. Για αυτό και αυτοί οι παράγοντες μπορεί να αναπτυχθούν ως υποσχόμενοι αντικαρκινικοί παράγοντες.



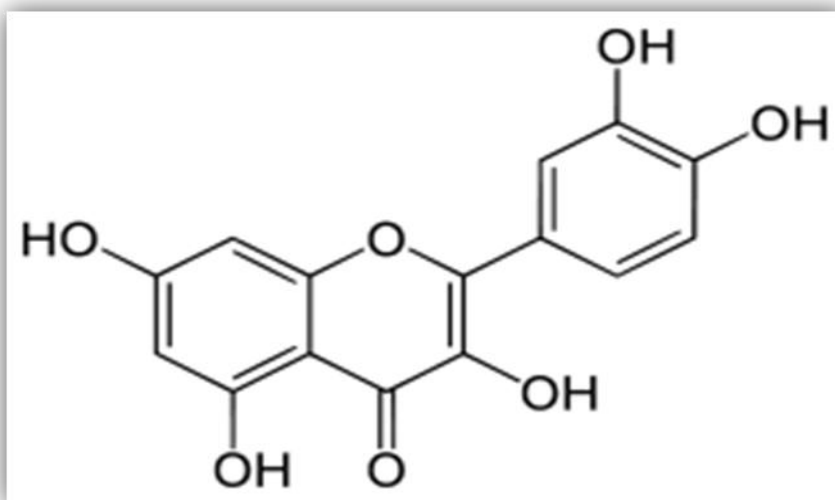
Εικόνα 5. Υπόθεση των δεσμών μεταξύ των μηχανισμών που λειτουργούν τα φλαβονοειδή και τα αποτελέσματά τους σχετικά με τη νόσο.

1.3 Κουερσετίνη

Η κουερσετίνη (3,3',4',5,7- pentahydroxyflavone), όπως και τα άλλα φλαβονοειδή, είναι παρούσα σε φρούτα και σε λαχανικά και έχει προσελκύσει την προσοχή ως δυνατό αντικαρκινογόνο. Η αντικαρκινική της δράση οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την αντιοξειδωτική της δράση, την αναστολή των ενζύμων που ενεργοποιούν την καρκινογένεση, την τροποποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος και την αλληλεπίδραση με υποδοχείς και άλλων πρωτεϊνών (188-190).

Η κουερσετίνη είναι μια φλαβονόλη. Τα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένης της κουερσετίνης, συνήθως, βρίσκονται ως Ο-γλυκοζίτες, στους οποίους τουλάχιστον μία ομάδα υδροξυλίου μπορεί να αντικατασταθεί από διάφορα είδη σακχάρων. Οι φυσικές ιδιότητες της κουερσετίνης και άλλων φλαβονολών οφείλονται στην υδροφοβική δομή τους. Η διαλυτότητά τους σε νερό αυξάνεται με την αύξηση των ομάδων του σακχάρου. Οι χημικές ιδιότητες της κουερσετίνης αποδίδονται στην ιδιότητα της να δώσει ηλεκτρόνια, το οποίο συμβαίνει χάρη στην παρουσία μιας φαινολικής υδροξυλικής

ομάδας. Αυτή η ιδιότητα είναι ουσιώδης για να ασκηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, όπως τα ανιόντα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και ελεύθερες ρίζες υπεροξυδίου (HO_2^{\cdot}). Η τοποθεσία και ο αριθμός των ομάδων υδροξυλίου, που είναι προσδεσμένες στον σκελετό της βασικής δομής του φλαβονοειδούς, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιοξειδωτική του δράση. Έχει προταθεί ότι η κουερσετίνη και τα ανάλογα της, δρουν ως αντιοξειδωτικά αναστέλλοντας τα οξειδωτικά ένζυμα όπως, την οξειδάση της ξανθίνης (XOD), την λιποξιγενάση (LOX), και την NADPH οξειδάση. Η αναστολή των ενζύμων αυτών είναι υπεύθυνη και για την εξασθένηση του οξειδωτικού στρες, επειδή αυτά έχουν σημαντικό ρόλο στην αρχική διαδικασία της επαγωγής κυτταρικής καταστροφής από τις ελεύθερες ρίζες (191).



Εικόνα 6: Κουερσετίνη

1.3.1 Ο κυτταρικός κύκλος ως πιθανός στόχος

Μια σημαντική δράση της κουερσετίνης είναι να ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, διαμορφώνοντας κάποιους μοριακούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης p21, της B κυκλίνης, της πρωτεΐνης p27, των κυκλινών που εξαρτώνται από κινάσες και της τοποισομεράσης II, εάν και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν έχουν ξεκαθαριστεί ακόμα. Εξαρτώμενη από το κύτταρο και την προέλευση του όγκου, η κουερσετίνη μπορεί να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην μετάβαση από τη G2 στην M φάση και από τη

G1 στην S φάση. Ειδικά, η κουερσετίνη προκαλεί αναστολή της G2/M φάσης σε ανθρώπινο καρκίνο των επιθηλιακών κυττάρων του οισοφάγου, μέσω της αυξορύθμισης της p73 και της p21waf1 και μετέπειτα με μειορύθμιση της B1 κυκλίνης, στα επίπεδα του mRNA και των πρωτεϊνών (192). Σε καρκίνο του μαστού και στις κυτταρικές σειρές SK-Br3, MDA-MB-231, και MDA-MB-453, μικρές δόσεις κουερσετίνης ανέστειλαν το πολλαπλασιασμό. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει στην G1 φάση, μέσω της επαγωγής της p21 και μέσω της ταυτόχρονης μείωσης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστόματος (pRb). Στο ίδιο κύτταρο, η κουερσετίνη μειορυθμίζει την κυκλίνη B1 και την κυκλίνη που εξαρτάται από την κινάση 1 (CDK), τα οποία είναι ουσιώδη για να προχωρήσει η φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου (193). Σε κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του πνεύμονα NCI- H209, η κουερσετίνη επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M αυξάνοντας την έκφραση πρωτεϊνών όπως η κυκλίνη B, η Cdc25c-ser-216-p και η Wee 1 (μια κινάση του πυρήνα που ανήκει στην οικογένεια Ser/Thr) (194). Μια παρόμοια αντι-πολλαπλασιαστική δράση έχει παρατηρηθεί σε επιθετικές καρκινικές σειρές του προστάτη, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κάποια δράση σε μη επιθετικές καρκινικές σειρές (195). Σε HepG2 κύτταρα του ήπατος, η κουερσετίνη αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1, και ασκεί τη δράση αυτή, μέσω της αύξησης της πρωτεΐνης p21, της p27 και της p53 (196). Η επίδραση της παρουσίας ή της απουσίας της p53 στην επαγωγή της κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης, είναι σύμφωνη με την συμμετοχή της κουερσετίνης στην ισορροπία οξειδωσης του κυττάρου. Αυτό εξηγείται από ένα ανεπτυγμένο μοντέλο της p53 που εξαρτάται από ρύθμιση των ενδοκυτταρικών ROS. Η p53 μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση σε μη στρεσαρισμένα ή λίγο στρεσαρισμένα κύτταρα μέσω της ρύθμισης γονιδίων που συνδέονται με αυτή τη δράση.

1.3.2 Η προ-αποπτωτική δράση της κουερσετίνης.

Η προ-αποπτωτική δράση της κουερσετίνης μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών μονοπατιών. Στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 η προσθήκη κουερσετίνης αυξάνει τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και μειώνει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP), προωθώντας έτσι την ενεργοποίηση της κασπάσης-3,

-8 και -9 (197). Η ικανότητα της κουερσετίνης να επάγει την απόπτωση, μέσω του μονοπατιού των μιτοχονδρίων, έχει επιβεβαιωθεί στην κυτταρική σειρά U937 (human leukemic monocyte lymphoma) (198, 199). Σε αυτά τα κύτταρα η κουερσετίνη διακόπτει την MMP (198, 199), η οποία από την πλευρά της επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (200) και ακολούθως ενεργοποιεί πολλαπλές κασπάσες όπως η κασπάση -3 και η -7. Δεύτερον, η κουερσετίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων και την απόπτωση, μειορρυθμίζοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα της σηματοδότησης της β-κατεχίνης/Tcf και με την μειορύθμιση της κυκλίνης και της σουρβιβίνης (survivin)(201, 202). Η κουερσετίνη επάγει τη ρύθμιση της απόπτωσης μέσω της διαμόρφωσης της σουρβιβίνης και έχει δείξει να έχει έναν αμφιλεγόμενο τρόπο σε κύτταρα γλοιώματος, όπως και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του πνεύμονα (203, 204). Έτσι, ενώ σε κύτταρα γλοιώματος, η έκθεση στην κουερσετίνη οδηγεί σε υποβάθμιση του πρωτεασώματος της σουρβιβίνης (204), σύμφωνα με ένα άλλο προτεινόμενο μοντέλο η θεραπεία με κουερσετίνη αυξάνει την B1 κυκλίνη και την πρωτεΐνη p53, που αυξάνει την έκφραση της σουρβιβίνης και της πρωτεΐνης p21, και ως αποτέλεσμα υπάρχει αναστολή της απόπτωσης (203). Τρίτον, η κουερσετίνη επάγει την απόπτωση μέσω της παραγωγής των ROS και την ενεργοποίηση της AMPKα1 και της ASK1, που μεταγενέστερα ακολουθείται από ενεργοποίηση της p38 και δέσμευση των κασπασών (205). Τέταρτον η αντιπολλαπλασιαστική και η προ-αποπτωτική της δράση, μπορεί να συνδέεται με την δυνατότητα της κουερσετίνης να δεσμεύει κατευθείαν την τουμπουλίνη, προκαλώντας τον αποπολυμερισμό των κυτταρικών μικροσωληνίσκων (96, 206). Πέμπτον, η κουερσετίνη είναι ένας επαγωγέας του TNF, που επάγει την απόπτωση μέσω της επαγωγής της έκφρασης του υποδοχέα θανάτου (DR)-5, ένα φαινόμενο που συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη(207). Η ικανότητα της κουερσετίνης να επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα, κάνει το μόριο αυτό να είναι ενδιαφέρον για το πεδίο της ογκολογίας.

1.3.3 Τα φυσιολογικά κύτταρα συνεχίζουν να συμπεριφέρονται φυσιολογικά.

Παρά το γεγονός ότι η δράση της κουερσετίνης έχει μελετηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, για την δράση της στα φυσιολογικά κύτταρα δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Η κύρια διαφορά μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων είναι ότι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι επιρρεπείς στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, σε συγκεντρώσεις της κουερσετίνης που έχουν μικρή ή δεν έχουν καμία δράση σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα (208). Για παράδειγμα σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα, η κουερσετίνη επιφέρει κυτταροτοξικότητα, αυξάνει τις ενδοκυτταρικές ROS, μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, που είναι από 100-500μΜ (208). Πρόσφατα, έχειδειχτεί ότι η θεραπεία των περιφερειακών λεμφοκυττάρων του αίματος με κουερσετίνη, προκαλεί απώλεια στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης μόνο σε ένα μικρό αριθμό κυττάρων και αυτή η δράση συμβαίνει μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, που είναι μεγαλύτερες από 100μΜ (199).

1.3.4 Τροποποίηση μεταγωγής σήματος.

Υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με την δράση της κουερσετίνης και των φλαβονοειδών στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που συνδέονται με την διαδικασία της καρκινογένεσης. Αυτά συμπεριλαμβάνουν την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την αντιφλεγμονώδη δράση και την αγγειογένεση. Για παράδειγμα, η κουερσετίνη επάγει την απόπτωση στα ανθρώπινα HepG2 ηπατικά κύτταρα, μέσω δύο ευδιάκριτων μηχανισμών: το μιτοχονδριακό μονοπάτι (ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και -9, αλλά όχι της κασπάσης-8, μείωση της αναλογίας του Bcl-xL: Bcl-xS, και αύξηση της μετατόπισης του προ-αποπτωτικού Bax στην μιτοχονδριακή μεμβράνη), και ο αποκλεισμός της κυτταρικής επιβίωσης υπέστη αναστολή από τα κύρια σήματα επιβίωσης, την εξωκυττάρια Akt, και την εξωκυττάρια ERK (signal regulated kinase) (209). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι, συγκεκριμένα η κουερσετίνη και όχι η απιγενίνη ή η λουτεολίνη ενεργοποιεί τον κατακερματισμό του DNA, την διάσπαση της πολυμεράσης της ADP- ριβόζης, την αυξορύθμιση της Bax και την τροποποίηση του αντιαποπτωτικού Bcl-2 στην κυτταρική σειρά HL60 ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα (210). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δράση της κουερσετίνης στην απόπτωση μπορεί να αντιστραφεί όταν τα

κύτταρα εκτίθενται στο οξειδωτικό στρες (211). Η κουερσετίνη εξασθενεί την επαγωγή της απόπτωσης, που επάγεται από το H_2O_2 σε μεσαγγειακά κύτταρα, μέσω της αναστολής της δράσης της JNK (c-Jun N-terminal kinase) και των ERKs, αλλά όχι της p38 πρωτεϊνικής κινάσης, που ενεργοποιείται από μιτογόνα (MAPK).

1.3.5 Η κουερσετίνη και η αναστολή των πρωτεϊνών συνοδών.

Η επιστήμη δείχνει ότι η κουερσετίνη επάγει την αναστολή των πρωτεϊνών συνοδών και αυτό μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου (212, 213). Οι πρωτεΐνες συνοδοί είναι υπεύθυνες για την σωστή αναδίπλωση και την διατήρηση των πρωτεϊνών στο σώμα. Όταν οι πρωτεϊνικοί συνοδοί αδυνατούν να εκτελέσουν τα καθήκοντά τους, η λειτουργικότητα των κυττάρων μειώνεται και ο κυτταρικός θάνατος είναι εύλογος (213). Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) δεν ρυθμίζονται σε μερικά καρκινικά κύτταρα, και ξεκινάνε από ιονίζουσες ακτινοβολίες (213). Η κουερσετίνη είναι ικανή να απενεργοποιήσει αυτές τις πρωτεΐνες συνοδούς, από την ικανότητα της να αναστέλλει τις κινάσες, που βοηθάνε στην επαγωγή των HSP. Αυτή η ικανότητα μελετάται ως ένας αντικαρκινικός μηχανισμός.

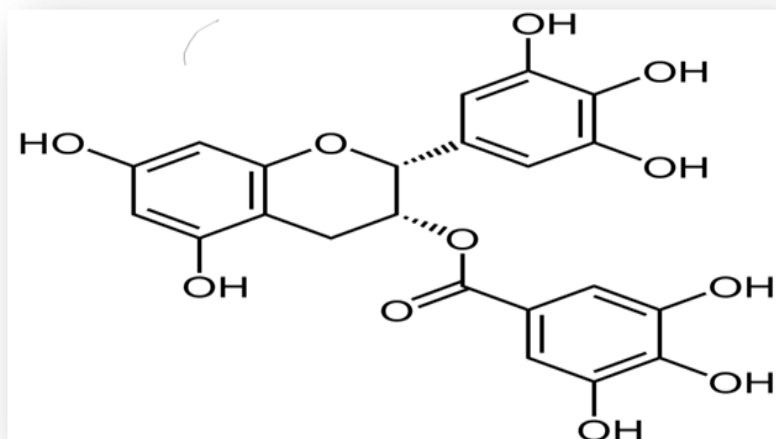
Η έκφραση της HSP70 επάγεται από ακτινοβολία, που προκαλείται από τη θερμότητα σε καρκινικά κύτταρα. Η θερμότητα επάγει την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα του θερμικού σοκ 1 (HSF1) είτε δύο κινασών, την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) και την CamKII (Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II). Με το που θα φωσφορυλιωθούν αυτές οι κινάσες ενεργοποιούν τον HSF1 (heat shock protein 1), ο οποίος καταλύει την αντιγραφή της HSP70. Πείραμα το οποίο έγινε σε κύτταρα Jurkat, έδειξε ότι η κουερσετίνη είναι ικανή να αναστείλλει την δράση της κινάσης CK2 και της CamKII, ακολούθως μειώνοντας την έκφραση της HSP70 και αυξάνοντας την ευαισθησία του όγκου στην ακτινοβολία (213). Αυτή η δράση δεν παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά HeLa. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η δράση της κουερσετίνης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων.

Η κουερσετίνη μειώνει την έκφραση της HSP90 σε κύτταρα του προστάτη (212). Η HSP90 είναι μία συνοδός που βοηθάει στη συντήρηση των ογκοπρωτεϊνών, όπως ο επιδερμικός παράγοντας αύξησης (HER2) και ο παράγοντας αύξησης IGFBP-2 (insulin like growth factor binding protein 2). Μπορεί να θεωρηθεί ότι μείωση της HSP90 στο κύτταρο,

μπορεί να οδηγήσει στην μείωση της λειτουργικότητας της ογκοπρωτεΐνης και μετά στην μείωση της ανάπτυξης του όγκου.

1.4 Επιγαλοκατεχίνη (EGCG)

Η παραγωγή τσαγιού από τα φύλλα του φυτού *Camellia Sinensis* είναι, μετά από το νερό, το πιο ευρέως καταναλώσιμο ποτό στον κόσμο. Το πράσινο τσάι είναι το πιο μελετημένο για τις ευεργετικές του ιδιότητες, που συμπεριλαμβάνουν τις χημειοπροληπτικές του ιδιότητες, επειδή η χημική του σύνθεση είναι πιο γνωστή από τα άλλα είδη τσαγιού (214). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χημειοπροληπτική δράση του πράσινου τσαγιού οφείλεται στις πολυφαινόλες του. Οι κύριες κατεχίνες του πράσινου τσαγιού είναι η (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), η (-)-epicatechin-3-gallate, η (-)-epigallocatechin και η (-)-epicatechin.



Εικόνα 7: Επιγαλοκατεχίνη

1.4.1 Επαγωγή της απόπτωσης και διακοπή του κυτταρικού κύκλου από την EGCG

Η απόπτωση είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός, μέσω του οποίου ανεπιθύμητα ή κατεστραμμένα κύτταρα εξαλείφονται από το σύστημα. Είναι σημαντικό για την κανονική ανάπτυξη, τον κυτταρικό κύκλο και την αντικατάσταση των κυττάρων στο σύστημα διαβίωσης. Επιπλέον, η απόπτωση χρησιμεύει ως προστατευτικός

μηχανισμός κατά της νεοπλασματικής ανάπτυξης σε έναν οργανισμό, εξαλείφοντας γενετικά κατεστραμμένα κύτταρα ή τα περίσσεια κύτταρα που έχουν γίνει εσφαλμένα ακατάλληλα για διαίρεση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η επιγαλοκατεχίνη επηρεάζει έναν αριθμό παραγόντων που συνδέονται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την άμεση αναστολή κινάσων εξαρτώμενων από κυκλίνες, το οποίο θεωρείται ως το κύριο συμβάν. Η επαγωγή των διαφόρων αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου μπορεί να είναι συνέπεια αυτής της αναστολής. Η EGCG, επίσης, επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p21 και της πρωτεΐνης p27, ενώ μειώνει την έκφραση της D1 κυκλίνης και την φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος. Τα πρώτα στάδια της απόπτωσης από επιγαλοκατεχίνη συμπεριλαμβάνουν την πυρηνική ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και τη διάσπαση πολυμεράσης της (ADP) ριβόζης. Επιπλέον, η EGCG ενεργοποιεί τη Bax και την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης για να διευκολύνεται η απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο. Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, η άμεση σύνδεση των πολυφαινολών του τσαγιού στον αντιαποπτωτικό θύλακα της BH3 (interacting-domain death agonist) των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, υποδηλώνει έναν μηχανισμό, στον οποίο η επιγαλοκατεχίνη αναστέλλει την αντιαποπτωτική δράση των Bcl-2 πρωτεϊνών. Η περιοχή της BH3 έχει αναγνωριστεί ως μια από τις περιοχές δέσμευσης των πολυφαινολών από τσάι (215).

1.4.2 Διαμόρφωση της κυτταρικής σηματοδότησης από EGCG

Αναστολή μονοπατιού σηματοδότησης του πυρηνικού παράγοντα κB. Ο πυρηνικός παράγοντας κB(NF-κB) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων, υπεύθυνα για την κυτταρική απόκριση, που συμπεριλαμβάνουν τη φλεγμονή, τη φυσική ανοσία, την ανάπτυξη και το θάνατο του κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι η υδροξυλική ομάδα στην θέση 3' στην EGCG είναι υπεύθυνη για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η επιγαλοκατεχίνη αναστέλλει την δράση του NF-κB σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου(216). Αγωγή με επιγαλοκατεχίνη έχει βρεθεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κB με δόσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο σε κανονικά ανθρώπινα επιδερμικά κερατινοκύτταρα(217). Έχει προσδιοριστεί ένας παράγοντας του συμπλόκου NF-κB, το NF-κB/p65 ως στόχος για τις κασπάσες κατά την απόπτωση από την

EGCG (218). Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι ο NF-kB θεωρείται ως ένας στόχος για την διαχείριση του καρκίνου, ενώ η διαφοροποίηση αυτού του μονοπατιού από επιγαλοκατεχίνη μπορεί να συμβάλει στις χημειοπροληπτικές του ιδιότητες.

1.4.3 Αναστολή της MAPK και του ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1

Οι MAPKs εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση και το θάνατο. Υπάρχουν τρία κύρια είδη των MAPKs στα κύτταρα των θηλαστικών, το εξωκυττάριο σήμα, του οποίου ρυθμίζεται από πρωτεΐνες κινασών (ERK), τη MAPK p38, και τη JNK (c-Jun NH₂-terminal kinases). Θεραπεία με επιγαλοκατεχίνη έχει δείξει να αναστέλλει την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου που επάγεται από UVB ακτινοβολία και ταυτόχρονα αναστέλλει την φωσφορυλίωση του ERK1/2, της JNK, και της πρωτεΐνης p38 (216, 217). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η επιγαλοκατεχίνη αναστέλλει το μονοπάτι MAPK και τη δράση του ενεργοποιητή της πρωτεΐνης -1 (AP-1) σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (217). Η θεραπεία αρουραίων με πράσινο τσάι που περιέχει EGCG έδειξε να αναστέλλει το μονοπάτι P13K σε αδενοκαρκίνωμα προστάτη σε διαγονιδιακά μοντέλα ζώων (219).

1.4.4 Αναστολή του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, μεσολαβητή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος.

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης του κυτταροπλάσματος με μια εξωκυττάρια τοποθεσία δέσμευσης υποκαταστάτη, μια ενιαία διαμεμβρανική περιοχή και με μία ενδοκυτταρική περιοχή που εμφανίζει ενδογενή δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης. Υπερέκφραση του EGFR παράγει ένα νεοπλασματικό φαινότυπο στα καρκινικά κύτταρα. Η επιγαλοκατεχίνη έδειξε να αναστέλλει την ενεργοποίηση του EGFR, της HER2 και πολλαπλών μεταγενέστερων σηματοδοτικών μονοπατιών στην καρκινική κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου(216).

1.4.5 Αναστολή της υπερέκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2.

Η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) επάγεται από διαφορετικούς παράγοντες όπως οι κυτοκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι επαγωγής του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί μη φυσιολογική δράση της (COX-2) σε πολλές παθολογικές μορφές, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η επιγαλοκατεχίνη έδειξε να αναστέλλει την έκφραση της COX-2 που επάγεται από μιτογόνο στην καρκινική σειρά PC-3 και τη LNCaP του προστάτη (220). Μελέτες έχουν δείξει ότι η επιγαλοκατεχίνη μειώνει την έκφραση πρωτεΐνης και τη δράση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), ακολουθώντας την επαγωγή της ιντερλευκίνης-1β ανθρώπινων χονδροκυττάρων (221). Αρκετές μελέτες προτείνουν την ανάπτυξη χημειοπροληπτικών ουσιών, οι οποίες μπλοκάρουν την έκφραση της COX-2 χωρίς να επηρεάσει την COX-1, η οποία αποτελεί υψηλή προτεραιότητα για την έρευνα του καρκίνου.

1.4.6 Διαμόρφωση της κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τη μετάσταση και τη μετανάστευση από την EGCG.

1.4.6.1 Αναστολή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι ένα μιτογόνο για κύτταρα του ενδοθηλίου και συνδέεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης στον καρκίνο. Ο VEGF συνδέεται στους υποδοχείς 1 και 2 του VEGF. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η επιγαλοκατεχίνη μειώνει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα του VEGF και επάγει την απόπτωση σε χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία των Β κυττάρων (205). Θεραπεία με επιγαλοκατεχίνη έχει δείξει να αναστέλλει τη μιτογένεση ενδοθηλιακών κυττάρων των αρτηριών του ομφάλιου λώρου (HUAEC). Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του VEGF στα HUAEC, συμπεριλαμβανομένων της αυτοφωσφορυλίωσης των υποδοχέων 1 και 2 του VEGF, τη φωσφορυλίωση της ERK1/2, και την έκφραση του mRNA της πρώιμης απόκρισης του αυξητικού παράγοντα-1 αναστάληκαν από προεπώαση των κυττάρων με EGCG (222). Η αναστολή του VEGF (vascular endothelial growth factor), προσδεδεμένου στον υποδοχέα του, μπορεί να συμβάλει στην αντιαγγειογένεση και στη δράση της επιγαλοκατεχίνης κατά του καρκίνου.

1.4.6.2 Αναστολή matrix μεταλλοπρωτεϊνών

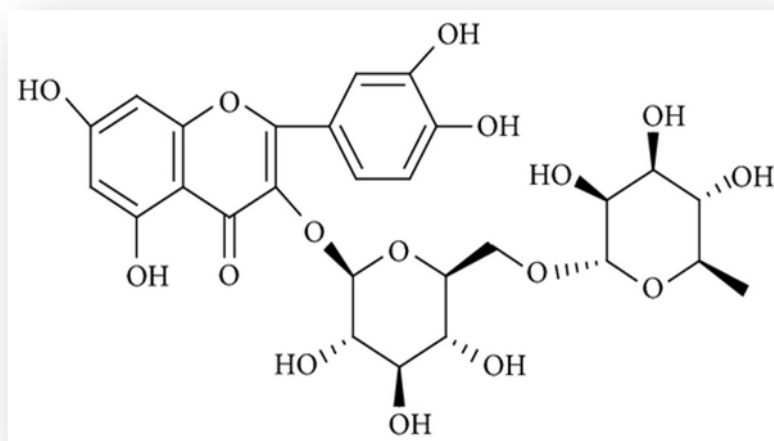
Η εξέλιξη του καρκίνου συμπεριλαμβάνει την οικογένεια matrix μεταλλοπρωτεϊνών (MMP). Δύο μέλη αυτής της οικογένειας, η MMP-2 και η MMP-9, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εισβολή και στη μετάσταση του καρκίνου. Αυτές εμπλέκονται στη μείωση του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης, κάτω από βασικές συνθήκες, καθώς και άλλων matrix πρωτεϊνών, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, για την αναδιαμόρφωση των ιστών και την επιδιόρθωση τους. Η επιγαλοκατεχίνη έχει δείξει να επηρεάσει τη δράση της MMP άμεσα και έμμεσα. Μελέτες έχουν δείξει ότι χορήγηση από του στόματος πολυφαινόλων πράσινου τσαγιού προκάλεσε σημαντική αναστολή της MMP-2 και της MMP-9 σε αρουραίους TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate)(219). Η επιγαλοκατεχίνη αναστέλλει την MMP-2 και την MMP-9 σε ενδοθηλιακά κύτταρα (223). Αυτά σημαίνουν ότι η επιγαλοκατεχίνη μπορεί να αναστέλλει ή να καθυστερήσει την εισβολή, τη μετάσταση και την αγγειογένεση μέσω της διαφοροποίησης της MMP.

1.5 Ρουτίνη

Η φυσική ρουτίνη (3,4,5,7,-τετραυδροξυφλαβόνη-3- ρουτινοζίτης) είναι ένα ελκυστικό φυτοχημικό, λόγω της φαρμακολογικής της δράσης. Θεωρείται ένα σημαντικό флаβονοειδές στη φαρμακευτική βιομηχανία (224). Πάνω από 130 θεραπευτικά παρασκευάσματα, που είναι εγγεγραμμένα ως φάρμακα, περιέχουν ρουτίνη στη συνταγή τους (225, 226).

Η ρουτίνη ανήκει σε ένα είδος γλυκοσιδωμένης φλαβόνης, που είναι γνωστό και ως βιταμίνη P. Η υδρόλυση της ρουτίνης παράγει την κουερσετίνη και την ρουτινόζη με καταλύτη την γλυκοσιδάση (227). Η κουερσετίνη, γενικά, συνυπάρχει με την ρουτίνη (228) και βρίσκονται, κυρίως, σε βρώσιμα φυτά όπως τα κρεμμύδια, τα μήλα, τα μούρα, το τσάι και το κρασί (229). Τόσο η ρουτίνη όσο και η κουερσετίνη είναι εξαιρετικές πηγές φαρμακευτικών προϊόντων και φυτοθεραπείας(230). Σημαντική πηγή φυσικής ρουτίνης θεωρείται το φαγόπυρο (*Fagopyrum esculentum*). Τα εναέρια μέρη του φυτού, τα φύλλα και στο άνθος, βρέθηκε να έχουν και τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις της

ρουτίνης. Η συγκέντρωση της ρουτίνης αυξήθηκε γρήγορα μετά από UV-B ακτινοβολία. Αυτά τα ευρήματα έχουν ενισχύσει την ιδέα ότι η ρουτίνη παίζει ρόλο στα φίλτρα UV, που σε συμφωνία με πολλές μελέτες, οι οποίες αναφέρουν ότι τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά από την ακτινοβολία UV-B (231).



Εικόνα 8 : Ρουτίνη

1.5.1 Η αντιφλεγμονώδη δράση της ρουτίνης

Η φλεγμονή είναι μια φυσική αντίδραση του οργανισμού στους τραυματισμούς, στη μόλυνση, και στην ανοσολογική απάντηση. Όταν υπάρχει φλεγμονή, προκαλούνται διάφορες ασθένειες από αλλεργίες μέχρι νεφρική ανεπάρκεια, καρκίνο, καρκίνο στο παχύ έντερο, άσθμα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και πολλά προβλήματα, που έχουν να κάνουν με την ηλικία. Η διαδικασία της φλεγμονής χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ενδιάμεσων προ-φλεγμονής όπως τα εικοσανοειδή, οι ROS και οι κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες είναι μικρά πρωτεϊνικά μόρια και συμπεριλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες, τις λεμφοκίνες, τις χημειοκίνες και συνδέονται με μόρια σηματοδότησης, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκου, τον (TNF)-α και τις ιντερφερόνες. Αυτά απελευθερώνονται από το κύτταρο και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Οι ROS διαιωνίζουν τη φλεγμονή, διευκολύνοντας την παραγωγή χημειοστατικών παραγόντων τοπικά (232).

Η κυκλοοξυγενάση αποτελείται από την κυκλοοξυγενάση 1 (COX-1) και την κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2), που είναι οι καταλύτες για τη σύνθεση προσταγλαδινών,

μετατρέποντας το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες. Η (COX-2) είναι επαγωγίμο ισομερές της κυκλοοξυγενάσης, που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας προφλεγμονωδών προσταγλαδινών στη φλεγμονώδη περιοχή. Οι προσταγλαδίνες είναι γνωστές ως ενδιάμεσα για την φλεγμονώδη αντίδραση. Υψηλές συγκεντρώσεις προσταγλανδίνης E2, έχουν αναφερθεί στις περιοχές φλεγμονής κατά την μετατροπή του αραχιδονικού οξέος, καταλυόμενο από την (COX-2) (227). Η μετατροπή, επίσης, παράγει την προσταγλαδίνη H2, την προστακυκλίνη και την A2 θρομβοξάνη ως ενδιάμεσα(233). Η κουερσετίνη, που είναι μια αγγλικόνη της ρουτίνης, μπορεί να μπλοκάρει τα μονοπάτια κυκλοοξυγενάσης και την λιποοξυγενάση σε μεγάλες συγκεντρώσεις(234).

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για αποτελεσματικά φυσικά βιοδραστικά μόρια για την αναστολή της (COX-2). Αυτό το ένζυμο είναι ο στόχος για την φαρμακολογική δράση μη στεροειδών αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων (235). Η αναγνώριση εκλεκτικών αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης (COX-2) από φυσικές πηγές έχει γίνει ένα σημαντικό θέμα για φαρμακολογικές έρευνες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα υπάρχοντα φάρμακα δεν μπορούν να αποτρέψουν την εξέλιξη της φλεγμονής, οδηγώντας σε διάβρωση και παραμόρφωση(235). Η ρουτίνη μπορεί να είναι ένας δυνατός υποψήφιος για την αναστολή της (COX-2) με μοναδικό μηχανισμό δράσης(235). Η θεραπεία με ρουτίνη παρουσιάζει εμφανή ανασταλτική δράση των λιποπολυσακχαριτών, που επάγουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, σε *in vitro* πρωτογενή περιτοναϊκά μακροφάγα. Η ίδια παρατήρηση έχει αναφερθεί για *in vivo* λιποπολυσακχαρίτες σε ποντίκια, εγχέοντας δόση των 6 mg/kg σωματικού βάρους ρουτίνης (227).

Ένα χρόνο μετά βρέθηκε ότι, *in vivo* θεραπεία με ρουτίνη σε ποντίκια με σηπτική αρθρίτιδα, αναφέρθηκε ότι εμφανίζουν 92% αναστολή της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (236). Η αναστολή της (COX-2) μπορεί να εξασθενίσει τα συμπτώματα της φλεγμονής και να μειώσει το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου (Levy 1997, Wong 1998). Επομένως, η αντιφλεγμονώδη δράση της ρουτίνης βρέθηκε να είναι ευεργετική για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και οστεοαρθρίτιδας (232). Η ιδιότητα της ρουτίνης κατά της αρθρίτιδας, αξιολογήθηκε με βάση τη δραστηριότητα της καταλάσης στην άρθρωση, το οποίο αναγνωρίζεται ως δείκτης της φλεγμονής.

1.5.2 Ιατρικές ιδιότητες της ρουτίνης

Υπάρχουν πολλές μελέτες, που συνδέονται με την βιολογική δράση της ρουτίνης, αν και οι μηχανισμοί αυτής της δράσης παραμένουν ακόμη άγνωστοι (227). Η ρουτίνη είναι αποτελεσματική στη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών(237). Η ιδιότητα της ρουτίνης κατά του διαβήτη είναι γνωστή, και έχει αποδειχθεί από θεραπεία με ρουτίνη διαβητικών ποντικών και έφερε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση στην ομοιόσταση της γλυκόζης(238). Η ομοιόσταση της γλυκόζης επιτυγχάνεται με αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης, με την αύξηση της περιεκτικότητας γλυκογόνου στο ήπαρ και τους μύες, αλλά και με τη μείωση της περιεκτικότητας του γλυκογόνου στο νεφρό. Ομάδα ερευνητών, επίσης, έδειξε ότι η ρουτίνη μπορεί να προστατέψει το νεφρό διαβητικών ποντικών, μειώνοντας τη συσσώρευση της υδροξυπρολίνης, της λαμινίνης και του κολλαγόνου τύπου IV, καθώς επίσης, μειώνοντας τους αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών του ιστού αλλά αυξάνοντας τη δράση της μήτρας μεταλλοπρωτεϊνών στο νεφρό (238). Αυξάνοντας την δράση των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας, τα ένζυμα είναι ικανά να αποδομούν όλα τα είδη πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας. Είναι γνωστό ότι ποικίλες πρωτεΐνες, επίσης, υποβάλλονται σε μη-ενζυματική γλυκοζυλίωση, πράγμα το οποίο συμβάλλει σε διαφορετικές μακροχρόνιες επιπλοκές της νόσου. Όλα αυτά τα αποτελέσματα, δείχνουν ότι η ρουτίνη μπορεί να αναβάλλει τη νεφρική βλάβη και μπορεί να γίνει ένα δυνατό φάρμακο στην πρόληψη της πρόωρης διαβητικής νευροπάθειας (239, 240). Αυτό μπορεί να αποτρέψει τη γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε άλλες επιπλοκές του διαβήτη, όπως η καταστροφή νεύρων και η τύφλωση (241).

Η ρουτίνη ήταν σε θέση να αντιστρέψει την χωρική διαταραχή της μνήμης και την καταστροφή πυραμιδικών νευρώνων στην περιοχή του ιππόκαμπου. Επίσης, έχει αναφερθεί η *in vitro* νευροπροστατευτική δράση της ρουτίνης με τη χρήση μεθόδων αναστολής ενζύμων, όπως της ακετυλοχολινεστεράσης, της βουτυρύλοχολινεστεράσης και της τυροσινάσης (242). Αυτά θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα ευρήματα ερευνητών που αναφέρουν τη θετική δράση της ρουτίνης στην βελτίωση της όρασης και την ικανότητα ακοής, στην υπέρταση (243, 244) και στην εξασθένηση της μνήμης(236, 245). Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση της ρουτίνης μπορεί να αναστέλλει τη γλυκοζυλίωση

πρωτεϊνών, αλλά η δράση της στη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών είναι χαμηλότερη από την αγλυκόνης της, την κουερσετίνη.

Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι η ρουτίνη μπορεί να μειώσει τη χοληστερόλη, μειώνοντας τα επίπεδα λιπιδίων, ειδικά αυτά με χαμηλή πυκνότητα και αυτά με πολύ χαμηλή πυκνότητα, αλλά αυξάνει τα επίπεδα υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα (246, 247). Η ρουτίνη είναι ένα ελπιδοφόρο φλαβονοειδές, για τη μείωση κινδύνου αθηροσκλήρωσης, λόγω της ικανότητας της να αναστέλλει την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (248). Έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα της ρουτίνης σε καρδιαγγειακές παθήσεις όπως, στην ελάττωση της μη κανονικής ροής του αίματος, στην τριχοειδή δυσλειτουργία και στην φλεβική ανεπάρκεια σε καρδιαγγειακές παθήσεις (121, 249, 250). Επίσης έχει δείχτεί, η αναστολή στη συσσώρευση αιμοπεταλίων, που μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλικό επεισόδιο, έμφραγμα μυοκαρδίου, πνευμονική εμβολή ή απόφραξη αγγείων σε άλλα σημεία του σώματος (251).

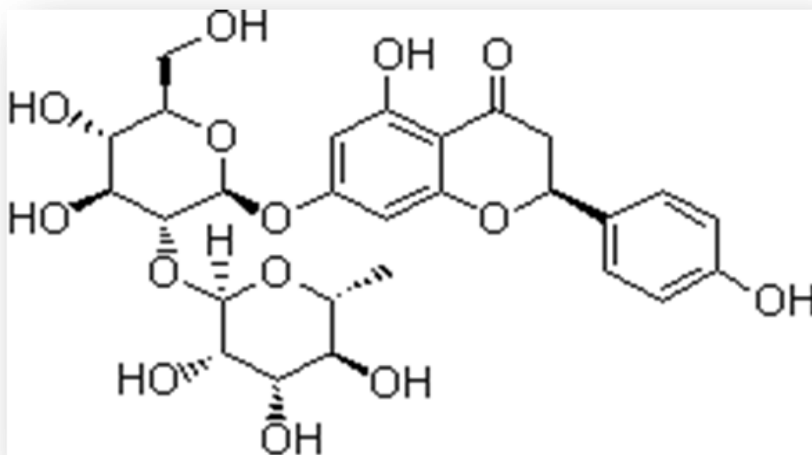
1.5.3 Αντικαρκινική δράση της ρουτίνης

Μια άλλη γνωστή δράση της ρουτίνης είναι και η αντικαρκινική της δράση. Η αντικαρκινική της δράση έχει παρατηρηθεί *in vitro* μέσω της αναστολής διάφορων καρκινικών σειρών και της μείωσης της ανάπτυξης όγκου σε πειραματικά ζώα (252-254). Η μείωση θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναστολή του DNA, των τοποϊσομεράσεων II και I, οι οποίες αποτελούν δείκτες καταστροφής του DNA και χρωμοσωμάτων (255).

1.6 Ναρινγίνη

Η Ναρινγίνη, η οποία χημικά είναι γνωστή ως 4,5,7-τριυδροξυφλαβανονη-7-ραμνογλυκοσίδιο είναι μία φλαβανόνη, την οποία την βρίσκουμε στις ντομάτες, το γκρέιπ φρουτ και σε πολλά άλλα εσπεριδοειδή. Υπάρχει πειραματική τεκμηρίωση για τις βιολογικές ιδιότητες της ναρινγενίνης, όπως η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδη, και η αντιαποπτωτική δράση. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει την χρησιμότητα της σε διαφορετικές κλινικές μελέτες στην αθηροσκλήρωση, στις καρδιαγγειακές διαταραχές, στον διαβήτη, σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές, στην οστεοπόρωση και σε ρευματικές

διαταραχές. Εκτός από τα παραπάνω, η ναρινγενίνη είναι γνωστή για την χημειοπροληπτική της δράση και τις αντικαρκινικές της ιδιότητες σε διάφορα μοντέλα καρκίνου του μαστού, του ήπατος, του στόματος, του πνεύμονα, και των ωοθηκών.



Εικόνα 9: Ναρινγίνη

Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η ναρινγίνη λειτουργεί ως δεσμευτής υπεροξειδίου(256) και ως αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (257). Από μελέτες σε ερυθροκύτταρα υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την εξολόθρευση των ROS, τη μείωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, που διεγείρονται από τη διαπερατότητα του K^+ και την αναστολή της υπεροξειδωσής λιπιδίων (258). Αυτή η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών έχει συμβάλει στην αναστολή των νιτρωδών ιόντων, που επάγουν την οξείδωση της αιμογλοβίνης σε μεθ-αιμογλοβίνη στα ερυθροκύτταρα, από ναρινγίνη(259). Η ναρινγίνη έχει δειχτεί να αντιστρέφει τις ROS, που διαμεσολαβούν στην απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπασης-3, σε ανθρώπινα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα(260). Επίσης, η ναρινγίνη καταστέλλει σε σημαντικό βαθμό την υπεροξειδωση λιπιδίων, που επάγεται από σίδηρο, την οξείδωση πρωτεϊνών και τις βλάβες του DNA (261). Η αντιοξειδωτική δυνατότητα της ναρινγενίνης μπορεί να είναι σημαντική για την θεραπεία του διαβήτη και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Η ναρινγίνη μειώνει την υψηλή γλυκόζη, που προκαλείται από αυξορρύθμιση του ICAM-1(intracellular adhesion molecule 1), μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης γι' αυτό η δράση της έχει προταθεί για τη βελτίωση των μακροαγγειακών επιπλοκών του

διαβήτη(262). Έχει αποδειχθεί ότι η ναρινγενίνη αναστέλλει τις ROS, οι οποίες ενεργοποιούν το μονοπάτι MAPK σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, που προκαλούν τραυματισμό στα H9c2 καρδιακά κύτταρα (263). Στα PC12 νευρικά κύτταρα, η ναρινγενίνη μπορεί να αναστέλλει σημαντικά το H₂O₂, το οποίο επάγει την κυτταροτοξικότητα, εξασθενώντας την κασπάση-3 και την έκφραση της MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), οπότε η ναρινγενίνη τονώνει το αντιοξειδωτικό σύστημα προστασίας και έχουμε βελτίωση της νευροεκφύλισης (264). Η ναρινγενίνη έχει δείξει σημαντική προστασία στις βλάβες του DNA, που προκαλούνται από ακτινοβολία UV-A, σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού C3H10T1/2 και σε ακτινοβολημένα λευκοκύτταρα με γ-ακτινοβολία, γεγονός το οποίο μπορεί να υφίσταται από την ικανότητα της να δεσμεύει O₂ (265).

1.6.1 Θεραπευτικές ιδιότητες της Ναρινγίνης

Φλεγμονή: Μελέτες έχουν δείξει ότι η ναρινγενίνη μεσολαβεί στην αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την έκκριση της IL-8 (interleukin-8), της MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) και της MIP-1 (macrophage inflammatory proteins), την έκφραση του mRNA και, επίσης, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2), της JNK (c-Jun N-terminal kinases) και της p38 MAPK, πιθανότατα, μπλοκάροντας την ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPK και NF-κB ((266). Η ναρινγενίνη έδειξε να αναστέλλει την COX-1 και την COX-2 και των λιποπολυσακχαριτών, που επάγουν την παραγωγή νιτρικού οξέος, και ως εκ τούτου, εμπλέκουν τη χρησιμότητα της στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλων φλεγμονωδών ασθενειών(267).

Αθηροσκλήρωση: Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ναρινγενίνη αναστέλλει *in vitro* την οξείδωση της LDL (Low density lipoprotein) και κατά συνέπεια μπορεί να επιβραδύνει τη διαδικασία αθηροσκλήρωσης (268). Ένας άλλος μηχανισμός της ναρινγίνης, ο οποίος έχει διεκρινιστεί, είναι η αναστολή της μεταφοράς μιας ακετυλικής ομάδας από τον PAF σε λυσοφωσφολιπίδια, που αποτρέπει την ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και ως εκ τούτου, καθυστερεί τη διαδικασία της ανάπτυξης μιας πλάκας αθηροσκλήρωσης (269).

Καρδιαγγειακές διαταραχές: Η ναρινγίνη προωθεί τη χαλάρωση σε *in vitro* απομονωμένη θωρακική αορτή αρουραίου, ως απάντηση στην φαινυλεφρίνη (έναν αγγειοσυστολέα), ο μηχανισμός για τον οποίο θεωρείται ότι είναι ένας αναστολέας της ροής του Ca^{2+} , και για την απελευθέρωση ασβεστίου από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα, υποδηλώνοντας ένα αγγειοχαλαρωτικό αποτέλεσμα (270). Αυτή η δράση υποστηρίχθηκε περαιτέρω και από άλλες μελέτες στο ενδοθήλιο αορτικών δακτυλίων αρουραίου, όπου χορηγήθηκε ναρινγίνη σε συγκεντρώσεις από 1-100 μM (271). Επιπλέον, η ροή του K^+ μπορεί να ενεργοποιηθεί από την ναρινγίνη από μία απευθείας ενεργοποίηση των εσωτερικών διαύλων καλίου (272). Η ναρινγίνη έχει δείξει να αναστέλλει την απόπτωση, που επάγεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, των H9c2 κυττάρων της καρδιάς, μέσω εξασθένησης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και διαμορφώνοντας το μονοπάτι της p38 (273).

Η καρδιοπροστατευτική δράση της ναρινγίνης παρατηρείται και σε *in vivo* πειράματα και έχει εξηγηθεί σε μοριακό επίπεδο, σύμφωνα με την οποία η ναρινγίνη έχει ασκήσει προστατευτική δράση έναντι της ισοπροτερενόλης, η οποία επάγει τη βλάβη του μυοκαρδίου, αυξάνοντας τη δράση της Na^+-K^+ -ΑΤΡασης, ενώ μειώνοντας αυτή της Ca^{2+} και Mg^{2+} ΑΤΡασης, όπως παρατηρείται από μια βελτίωση στο ηλεκτροκαρδιογράφημα αλλά και σε καρκινικούς δείκτες (274). Η ναρινγίνη, επίσης, μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος στο μυοκάρδιο σε βλάβη από επαναιμάτωση σε αρουραίους, μέσω της ρύθμισης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 27 και 70 και των MAPKs (275).

1.6.2 Δράση της ναρινγίνης στον καρκίνο

Καρκίνος του μαστού: Στον καρκίνο του μαστού η ναρινγίνη έχει δείξει να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινου καρκινώματος του μαστού, την κυτταρική σειρά MDA-MB-435 *in vitro* όσο και στην κυτταρική σειρά DMBA, οι οποίες επάγουν το σχηματισμό όγκου σε θηλυκούς αρουραίους Sprague-Dawley (172). Μοριακά δεδομένα έχουν δείξει ότι η ναρινγίνη αναστέλλει την οιστρόνη σουλφατάσης, ως εκ τούτου, εξασθενεί την ορμονική διέγερση καρκινικών κυττάρων του μαστού(276). Πειράματα στον υποδοχέα ER(+), ο οποίος είναι ένας υποδοχέας οιστρογόνου των MCF-7 και στη σειρά MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων μαστού, έχουν καταλήξει στο αποτέλεσμα ότι η ναρινγίνη κατέχει οιστρογονικές (σε χαμηλές συγκεντρώσεις) και αντιοιστρογονικές (σε

υψηλές συγκεντρώσεις) δράσεις, πρωτίστως, μέσω δέσμησης επιλεκτικά με ER α και ER β (υποδοχείς οιστρογόνου α και β). Επίσης, η ναρινγίνη αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό την απελευθέρωση του VEGF (Vascular endothelial growth factor) από την καρκινική σειρά μαστού MDA και ως εκ τούτου μειώνει το περιστατικό αγγειογένεσης, το οποίο είναι ένα από τους παράγοντες μετάστασης των καρκινικών κυττάρων (277).

Καρκίνος του ουροποιητικού-γεννητικού συστήματος: Η αγωγή με ναρινγίνη ενεργοποιεί τον υποδοχέα θανάτου και την διαμεσολαβούμενη από μιτοχόνδρια απόπτωση και ως εκ τούτου, μείωσε την επιβίωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (SiHa) και έδειξε τιμή IC₅₀, 750 μ M (278). Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα 5635 της ουροδόχου κύστης, η ναρινγίνη με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο ανέστειλε την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενεργοποιώντας το μονοπάτι σηματοδότησης των Ras/Rafv, εξαρτώμενο από ERK (extracellular signal-regulated kinases).

Καρκίνος στο συκώτι: Η ναρινγίνη έχει δείξει να προσφέρει σημαντική προστασία στην N-νιτροζοδιαιθυλαμίνη, που επάγει τον καρκίνο στο συκώτι σε αρουραίους(279).

Καρκίνος της στοματικής κοιλότητας: Σε μοντέλα χάμστερ, η ναρινγίνη μείωσε σημαντικά το βάρος του όγκου στο καρκίνο του στόματος επαγόμενο από DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) (280).

Καρκίνος του δέρματος: Σε μια *in vitro* μελέτη σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και σε ινοβλάστες, η ναρινγίνη αποτρέπει τη διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, ακολουθούμενη από έκθεση σε ακτινοβολία UV-A, η οποία θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον καρκίνο του δέρματος σε ανθρώπους (281).

Όγκοι μαλακών μορίων: Χορήγηση ναρινγίνης από το στόμα ανέστειλε την ανάπτυξη όγκου στο σάρκωμα, εμφυτευμένο σε ποντίκια (282). Σε αρουραίους με σάρκωμα walker256 (καρκινική σειρά μαστού σε αρουρέους), η ναρινγίνη ανέστειλε τον όγκο κατά 75%, μέσω της μείωσης των επιπέδων της IL-6 (interleukin 6) και του TNF- α (tumor necrosis α) (283).

1.7 Μη φλαβονοειδείς πολυφαινόλες

Εκτός από τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά αμίδια, υπάρχουν αρκετές μη-φλαβονοειδείς πολυφαινόλες, που βρίσκονται στα τρόφιμα, τα οποία θεωρούνται σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία. Μεταξύ αυτών, η ρεσβερατρόλη είναι μοναδική για τα σταφύλια και το κόκκινο κρασί. Το ελλαγικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν βρεθεί, π.χ. σε φράουλες και βατόμουρα. Υπάρχουν λιγνάνες δεσμευμένες στο λινάρι, στο σουσάμι και σε πολλά δημητριακά.

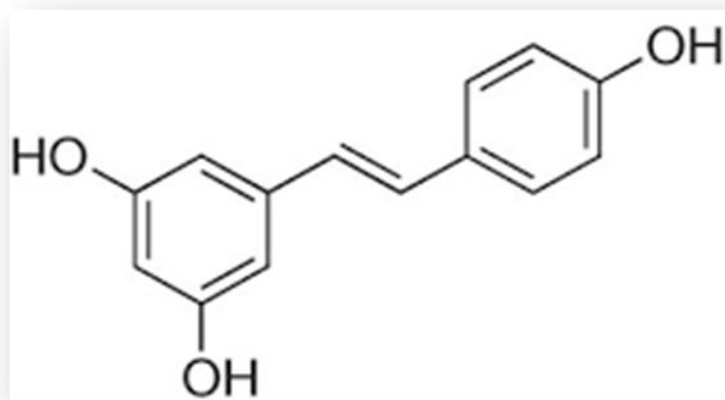
Μια άλλη κατηγορία, τα στυλβένια, έχουν τη δομή C6-C2-C6 και παράγονται από το φυτό ως απάντηση στις ασθένειες, στον τραυματισμό και στο στρες. Η κύρια πηγή στυλβενίων στη δίαιτα είναι η ρεσβερατρόλη από το κόκκινο κρασί και τα φιστίκια. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα, κατέδειξαν ότι και άλλες ενώσεις στυλβενίου, όπως το pterostilbene (3,5-διμεθυλο παράγωγο αιθέρα της ρεσβερατρόλης) μπορεί να έχουν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και έχουν καλύτερη νευροπροστατευτική δραστηριότητα, καλύτερη από την ίδια την ρεσβερατρόλη (284).

1.8 Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη είναι μια ουσία, που ανήκει στην οικογένεια των στυλβενίων, μια τάξη αρωματικών φυτοχημικών, που υπάρχουν στην *trans* και την *cis* μορφή. Βρίσκονται, κυρίως, στη φύση στα φιστίκια (*Arachishypogaea*) (285) και στα σταφύλια (*Vitis vinifera*)(286-288). Άλλες φυσικές πηγές ρεσβερατρόλης είναι τα μούρα, τα βατόμουρα, τα κράνμπερι, τα μύρτιλλα, και ο λυκίσκος (289, 290). Εμπορικά προϊόντα του σταφυλιού και των κράμπεριες, συμπεριλαμβανομένου του κόκκινου κρασιού, περιέχουν μεγάλες ποσότητες ρεσβερατρόλης (288). Η ρεσβερατρόλη απελευθερώνεται από τη φλούδα των σταφυλιών κατά την εμπορική παραγωγή του κρασιού. Τα εμπορικά λευκά κρασιά περιέχουν και αυτά ρεσβερατρόλη, αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση από τα κόκκινα (291). Η χημική δομή της ρεσβερατρόλης βρίσκεται και στην μορφή του *cis* ισομερούς, το οποίο βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα στα κρασιά από το *trans* ισομερές. Έχει αναφερθεί ότι η *cis*-ρεσβερατρόλη υπερσχύει του *trans* ισομερούς στα ιταλικά κόκκινα

κρασιά. Η ρεσβερατρόλη περιλαμβάνει δυο αρωματικούς δακτύλιους, που ενώνονται μεταξύ τους με μια γέφυρα αιθυλενίου. Τα αρωματικά δακτύλια, κατέχουν τρεις ομάδες υδροξυλίου, που συνδέονται με τα άτομα του άνθρακα, όπως παρατηρείται σε πολλές πολυφαινολικές ουσίες.

Η ανακάλυψη της ρεσβερατρόλης, ως ένα βιοδραστικό φυτοχημικό στο κόκκινο κρασί, ακολούθησε τις εκθέσεις για το «Γαλλικό παράδοξο» και μιας προσπάθειας να λυθεί η ανακάλυψη ότι στην Γαλλία, άτομα τα οποία είχαν μία δίαιτα, πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, δεν είχαν εμφανίσει αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (292). Αυτή η παρατήρηση οφειλόταν στην κατανάλωση κόκκινου κρασιού σε αυτόν τον πληθυσμό (292), και οι πολυφαινολικές ουσίες του κόκκινου κρασιού θεωρήθηκαν ως τα ενεργά συστατικά (293). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει την θεραπευτική δράση της ρεσβερατρόλης στον καρκίνο και στη φλεγμονή (294). Μελέτη για τις αντικαρκινικές ιδιότητες 4 πολυφαινολών στο κόκκινο κρασί, προτείνει ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να είναι η πιο δραστική αντικαρκινική ουσία στο κόκκινο κρασί, μετά από χορήγηση από το στόμα σε ανθρώπους (295).



Εικόνα 10 :Ρεσβερατρόλη

1.8.1 Αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης

Η ακτινοθεραπεία και οι διάφορες μορφές χημειοθεραπείας έχουν θεωρηθεί ως οι κύριοι τρόποι θεραπείας του καρκίνου. Αυτές οι θεραπευτικές μέθοδοι βασίζονται στην τοξικότητα των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) για την εξάλειψη καρκινικών κυττάρων, αλλά η αποτελεσματικότητά είναι περίπλοκη, από την ανάγκη στο να κρατηθεί μια

ισορροπία μεταξύ της ανεκτικότητας από τα φυσιολογικά κύτταρα και της ανάπτυξης της ανθεκτικότητας σε πολλούς καρκίνους.

Η ανακάλυψη πρόσθετων ουσιών, που ενισχύουν την ευαισθησία σε βιοφαρμακευτικά, σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή σε χημικά, χωρίς να προκαλούν τις ανεπιθύμητες αρνητικές επιπτώσεις, αποτελεί μια πρόκληση στη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο. Μελέτες έχουν δείξει ότι φυτοχημικά, που προφυλάσσουν από καρκίνο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο συνδυασμό με υπάρχουσα κύρια θεραπευτικά σχήματα, και στην περίπτωση της ρεσβερατρόλης, υπάρχει τώρα μια πληθώρα αποδεικτικών στοιχείων, που δείχνουν ότι αυτή η ουσία ενισχύει τη δράση των χημειοθεραπευτικών, για παράδειγμα της δοξορουβικίνης και της σισπλατίνης σε διάφορα μοντέλα όγκου. Το σημαντικό είναι ότι η ευαισθητοποίηση από την ρεσβερατρόλη επηρεάζει μόνο τα καρκινικά κύτταρα και όχι τα φυσιολογικά.

Το TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) μονοπάτι είναι ένα από τα εξωτερικά μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου, που αποτελείται από υποδοχείς, και από ειδικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι προκαλούν καταρράκτες, που οδηγούν στην επαγωγή της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση του TRAIL απαιτεί πρόσδεση του υποκαταστάτη για να συνδέσει τους υποδοχείς θανάτου του TRAIL, οδηγώντας σε γρήγορη επαγωγή της απόπτωσης από έναν ανεξάρτητο από τη p53 μηχανισμό, επιλεκτικό στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάσει τα φυσιολογικά κύτταρα(296, 297). Μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία με TRAIL, αναστέλλει την ανάπτυξη του ανθρώπινου μωσχεύματος σε ποντίκια, ευαίσθητα στον TRAIL, προσφέροντας την υπόσχεση της ειδικής και εκλεκτικής εξάλειψης καρκινικών κυττάρων. Μελέτες έχουν αποκαλύψει την αποτελεσματικότητα ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της ρεσβερατρόλης. Η ρεσβερατρόλη επάγει την TRAIL-επαγόμενη απόπτωση στον προστάτη (298, 299), στο μελανώμα (300), και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (301). Οι μηχανισμοί, που προτείνονται για τα ενισχυτικά αποτελέσματα του TRAIL της ρεσβερατρόλης, συμπεριλαμβάνουν την αναστολή φωσφορυλίωσης της Akt (298), τη ρύθμιση του υποδοχέα του TRAIL (299), την αυξημένη έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bax (που αποτελεί ρυθμιστή της απόπτωσης), η PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis)(299) και τη ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών(300).

1.8.2 Η ρεσβερατρόλη ευαισθητοποιεί την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων

Η χημειοθεραπεία είναι μια πρωτογενής μορφή θεραπείας για ασθενείς, που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο. Η αποτελεσματικότητα της βασίζεται στη στόχευση κυττάρων, τα οποία διαιρούνται γρήγορα, αλληλεπιδρώντας με το DNA τους, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των Peto Rn κυττάρων και επάγοντας την απόπτωση. Μελέτες έχουν (302) αναγνωρίσει τον καρκίνο ως μια χρόνια γενετική ασθένεια, που επιδέχεται παρέμβαση στα πρώτα στάδια από διατροφικούς παράγοντες. Ως εκ τούτου, είναι οι διαιτητικοί παράγοντες, που επηρεάζουν τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα, ενώ την ίδια στιγμή, μειώνουν το όριο της τοξικότητας. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να εκπληρώσει ένα τέτοιο ρόλο. Έτσι, η ρεσβερατρόλη μαζί με την σισπλατίνη και την δοξορουβικίνη έχουν δείξει να έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη, καρκινικών κυτταρικών σειρών και ωοθηκών και της μήτρας(303).

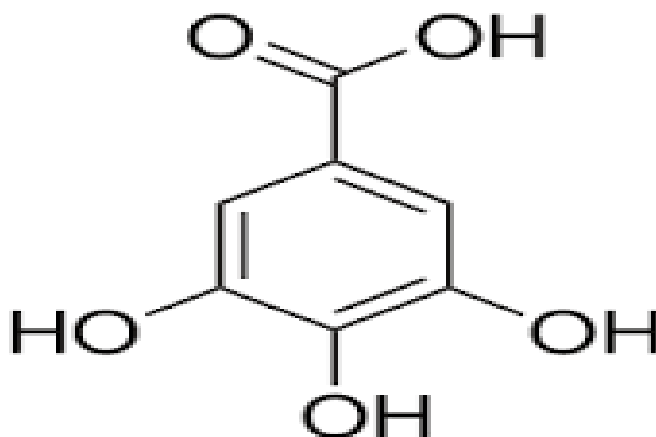
1.8.3 Ενίσχυση της δράσης της ιονίζουσας ακτινοβολίας από την ρεσβερατρόλη

Η ακτινοβολία έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για νεοπλασματικές παθήσεις. Η θεραπεία με υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες κατά την διάρκεια της θεραπείας, αλλά και στα επόμενα χρόνια. Ένας περιορισμός της ακτινοβολίας στη θεραπεία του καρκίνου είναι η δημιουργία μιας κατάστασης υποξίας, η οποία μειώνει την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας, καταστέλλοντας τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Επομένως, έχουν γίνει πολλές μελέτες για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, συμπεριλαμβανομένης της χρησιμοποίησης φυσικών ουσιών, οι οποίες παρέχουν ασφάλεια, ενώ πολλές μελέτες έχουν γίνει και για την ταυτοποίηση νέων και ισχυρών φυσικών ουσιών που καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα ευαίσθητα στην ακτινοβολία. Η ρεσβερατρόλη έχει δείξει αύξηση της ευαισθησίας στην ακτινοβολία στο μελάνωμα(304) στο γλοιοβλάστωμα(305), στο δέρμα (306), και στα CaP κύτταρα (307).

1.9 Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ (3,4,5- τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) είναι μια πολύ γνωστή πολυφαινόλη και έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα κατά διάφορων καρκινικών κυττάρων. Το γαλλικό οξύ είναι μία ενδογενής πολυφαινόλη, που βρίσκεται στα φυτά και βρίσκεται σε αφθονία στο τσάι, στα σταφύλια, όπως και στο κρασί (308, 309). Το βρίσκουμε και σε φυτά, όπως ο δρυς και η καστανιά (310). Το γαλλικό οξύ είναι γνωστό ότι επηρεάζει φαρμακολογικά και βιοχημικά μονοπάτια και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική(311, 312), αντιφλεγμονώδη (313) αντιμεταλλαξιγόνα δράση (314) και αντικαρκινικές ιδιότητες(315, 316). Το γαλλικό οξύ είναι γνωστό και για την προ-οξειδωτική του ικανότητα, με τρόπο, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και παρουσία ιόντων μετάλλων. Η προ-οξειδωτική ικανότητα του γαλλικού οξέος έχει αναγνωριστεί σαν υποκινητής της απόπτωσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές(317, 318).

Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την προστατευτική δράση του γαλλικού οξέος στα χημικά που επάγουν την καρκινογένεση (319, 320). Το γαλλικό οξύ έχει διαφορετική δράση σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου και σε διαφορετικό μοριακό επίπεδο. Η δράση, κατά τον καρκίνο, κάνει αυτήν την ουσία ένα σημαντικό βιομόριο με θεραπευτικές χρήσεις. Το γαλλικό οξύ έχει δείξει κυτταροτοξική επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα και έχει λιγότερη τοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα (321). Αυτή η ιδιότητα κάνει το γαλλικό οξύ ένα πολύτιμο πρόσθετο μαζί με τις βιταμίνες και ως συμπλήρωμα διατροφής αποτρέπει τον κίνδυνο του καρκίνου(311).



Εικόνα 11 : Γαλλικό οξύ

1.9.1 Μοριακοί στόχοι του γαλλικού οξέος

1.9.1.1 Ενεργοποίηση της ATM κινάσης

Η αντικαρκινική δράση του γαλλικού οξέος οφείλεται σε επιλεκτικό κυτταρικό θάνατο, όπως συμβαίνει σε διάφορα ανθρώπινα και αρουραίων καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα (316, 322). Στην καρκινική σειρά του προσάτη DU145, ο αντικαρκινικός μηχανισμός του γαλλικού οξέος φαίνεται να βασίζεται στην ενεργοποίηση του ATM- Chk2, το οποίο απενεργοποιεί την φωσφορυλίωση της cdc25C/A φωσφατάσης, οδηγώντας στην συσσώρευση του cdc2 στην ανενεργή μορφή της φωσφορυλιωμένης -Tyr¹⁵ και κατά συνέπεια, συμβαίνει διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Αναστολή της ATM κινάσης από τον αναστολέα της καφεΐνης, που καταργεί το γαλλικό οξύ, προκάλεσε φωσφορυλίωση της ATM. Μέσα, τα οποία προκαλούν καταστροφή του DNA, είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν την ATM κινάση και επάγουν την απόπτωση, που εξαρτάται από ATM (323). Οι H2A.X (οι ιστονικές πρωτεΐνες στόχοι της ATM) φωσφορυλιώνονται από την ενεργοποιημένη ATM στη Ser¹³⁹. Μελέτες έχουν δείξει ότι το γαλλικό οξύ επάγει την φωσφορυλίωση της ιστόνης H2A.X στη Ser¹³⁹ στα DU145 κύτταρα, πράγμα το οποίο επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε συγκεκριμένες φάσεις.

1.9.1.2 Αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής

Η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή (RR) είναι το ένζυμο, που περιορίζει την ταχύτητα της de novo σύνθεσης του DNA, η οποία έχει χαμηλή ενεργότητα σε φυσιολογικά αδιαίρετα κύτταρα. Η έκφραση αυτού του ενζύμου είναι σημαντικά αυξημένη σε κακοήθη καρκινικά κύτταρα(324, 325). Η RR αναστέλλεται από μία υποομάδα σιδήρου του ενζύμου, το οποίο απαιτεί έναν υποκαταστάτη ελεύθερης τυροσίνης για να δράσει. Αυτή η υποομάδα αναστέλλεται από αναστολή ελευθέρων ριζών (326). Βρέθηκε ότι το γαλλικό οξύ αναστέλλει την RR, η οποία οδηγεί σε μεταβολές του dNTP (τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοζίτη). Αυτή η μεταβολή στο dNTP οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης του DNA σε καρκινικά κύτταρα, που πολλαπλασιάζονται γρήγορα και σε λευχαιμικά κύτταρα. Η διατάραξη του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης οφείλεται στο γαλλικό οξύ. Η ισορροπία του επιπέδου της dNTP είναι κρίσιμη για την σύνθεση του DNA

στα καρκινικά κύτταρα και η διαταραχή, που δημιουργείται από το γαλλικό οξύ, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη δράση κατά του καρκίνου.

1.9.1.3 Αναστολή της κυκλοοξυγενάσης

Η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στην ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένας από τους παράγοντες, που είναι υπεύθυνοι για αυτό, είναι το αυξημένο επίπεδο των προσταγλαδινών, οι οποίες δρουν ως ανοσοκατασταλτικά. Οι κυκλοοξυγενάσες είναι ένζυμα-κλειδιά στη σύνθεση προσταγλαδινών από το αραχιδονικό οξύ. Η υπέρ-έκφραση της COX-2 προκαλεί ογκογένεση και κάνει τα κύτταρα ανθεκτικά σε αποπτωτικά ερεθίσματα (327, 328). Μελέτες έχουν δείξει ότι το γαλλικό οξύ δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο της COX-2 και στο μη στεροειδές αντι-φλεγμονώδες φάρμακο (NSAID). Το GA δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας και των δυο COX-1 και COX-2 με πιο πολύ συγγένεια για την COX-2. Από τη στιγμή που η ρύθμιση και η υπερέκφραση της COX είναι σημαντικές για την ανάπτυξη του καρκίνου, τότε το γαλλικό οξύ μπορεί να αξιοποιηθεί για την θεραπεία του. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το GA αναστέλλει την κυκλοοξυγενάση-2 στις κυτταρικές σειρές K562, όπως και στα IR-K562 (329).

1.9.1.4 Μείωση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια πολύ σημαντική ουσία για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αποπτωτική δράση, επαγόμενη από το αντικαρκινικό φάρμακο, είναι αντιστρόφως συγκριτική με το περιεχόμενο της GSH (330, 331). Το γαλλικό οξύ έχει προσδιοριστεί και ως οξειδωτική ουσία και ως προ-οξειδωτική (332, 333). Ο επαγόμενος από το γαλλικό οξύ κυτταρικός θάνατος μπορεί να σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, που δημιουργείται από τα αυξημένα επίπεδα των ROS και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (316, 334, 335). Το GA προκαλεί δόσο- εξαρτώμενη αύξηση στον αριθμό των απεμπλουτισμένων κυττάρων με GSH στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα της GSH σε κύτταρα του πνεύμονα, που επώαστηκαν με GA, αυξήθηκαν σε πρώιμα στάδια. Πιθανώς, τα αυξημένα επίπεδα της GSH επέρχονται ως απάντηση σε αυξημένες ROS, που παράγονται από την θεραπεία με

γαλλικό οξύ. Συμπερασματικά, το γαλλικό οξύ αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα Calu-6 και A549 με την μείωση της GSH, όπως και η αλλαγή στα επίπεδα των ROS, ακολουθείται από απώλεια της MMP και απόπτωση (336).

1.9.1.5 Επαγωγή της απόπτωσης

Μελέτες έχουν δείξει επαγωγή της απόπτωσης στα 3T3-L1 λιποκύτταρα (337) και σε άλλα καρκινικά κύτταρα από το γαλλικό οξύ. Υπάρχουν 2 μονοπάτια, μέσω των οποίων η απόπτωση λαμβάνει μέρος, η εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια απόπτωση (το εσωτερικό μονοπάτι) και η εξαρτώμενη από υποδοχείς απόπτωσης (εξωτερικό μονοπάτι) (338). Το γαλλικό οξύ ενεργοποιεί σε σημαντικό βαθμό τις πρωτεΐνες Fas, FasL όπως και την p53 (337). Και τα δυο αποπτωτικά μονοπάτια ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 περιλαμβάνει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax, Bak, Bad και Bcl-XS και τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-XL, και Mcl-1. Το ποσοστό έκφρασης Bax/Bcl-2 είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στον καθορισμό της απόπτωσης(338). Μέσω της ρύθμισης των Bax και Bcl-2, το γαλλικό οξύ μπορεί να επάγει την απόπτωση στα 3T3-L1 λιποκύτταρα (337). Η επαγωγή της απόπτωσης από το γαλλικό οξύ στην κυτταρική σειρά HeLa συνοδεύεται από μια ελαφριά μειωμένη ρύθμιση της Bcl-2 και την αυξημένη ρύθμιση της Bax (339).

Έχει παρατηρηθεί ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μπορεί να ελεγχθεί από την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (340). Στα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκε γαλλικό οξύ, έδειξαν σημαντική μειωμένη ρύθμιση της πρωτεΐνης Bcl-XL και αυξημένη ρύθμιση των πρωτεϊνών Bak και Bad (337). Η Bax επάγει την κυτταρική απόπτωση μέσω της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) και ακόλουθως την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (340).

Η κασπάση-3 είναι ένα από τα κεντρικά ένζυμα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην τελική φάση της απόπτωσης (341). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η διάσπαση της μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει οριστεί ως ένα πρώιμο στάδιο της απόπτωσης, ενώ η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια ακολουθείται από την ενεργοποίηση της αλληλουχίας κασπάση 3/κασπάση 9 (342). Το γαλλικό οξύ σηματοδοτεί έναν υποδοχέα θανάτου και την σηματοδότηση της p53 (μέσω της ενεργοποίησης του ATM-Chk2) (343), την απώλεια του δυναμικού της

μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, με επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάτης-3 και -9. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1 λιποκυττάρων έδειξε αύξηση της ενεργοποίησης των κασπασών-3 και -9 μετά από χορήγηση γαλλικού οξέος. Η μελέτη έδειξε ότι το γαλλικό οξύ συμπεριλαμβάνει τον μηχανισμό των κασπασών-3 και -9 για την επαγωγή της απόπτωσης (337). Οι κασπάσες -6 και -7 φάνηκαν να χρειάζονται για την ολοκληρωτική επαγωγή της απόπτωσης από το γαλλικό οξύ. Ιδιαίτερα, ο αναστολέας της κασπάσης-8 μείωσε τον αριθμό των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HeLa, που είχαν βαφτεί με ανεξίνης, μετά από χορήγηση γαλλικού οξέος (339). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8, επιβεβαιώνει το μονοπάτι του υποδοχέα του κυτταρικού θανάτου στην απόπτωση, που επάγεται από GA (344, 345). Συμπερασματικά, το γαλλικό οξύ επάγει την απόπτωση, μέσω της ρύθμισης των Fas/FasL, p53, και της οικογένειας Bcl-2, μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών.

1.9.1.6 Δράση κατά της αγγειογένεσης

Ο πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένα σημαντικό βήμα στην αγγειογένεση (346). Το γαλλικό οξύ αναστέλλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των EA.hy926 και HUVECs κυττάρων, πράγμα το οποίο μπορεί να είναι λόγω της αναστολής του VEGF (vascular endothelial growth factor), ο οποίος επάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

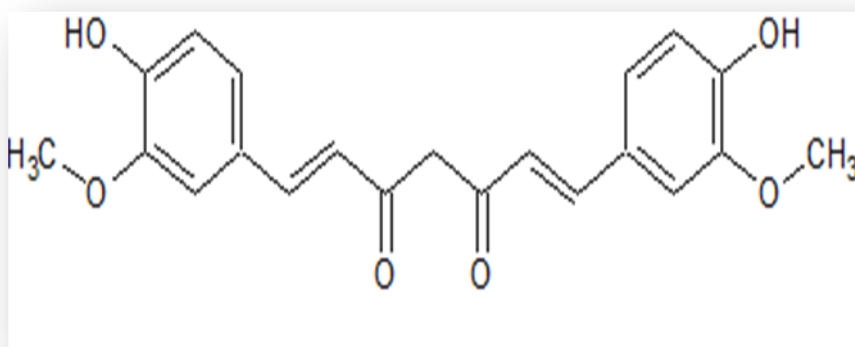
Οι κυκλίνες D1 και E είναι βασικές για την προώθηση της εξέλιξης των ενδοθηλιακών κυττάρων για την μετάβαση από την φάση G1 στην S. Το γαλλικό οξύ ρυθμίζει την κυκλίνη D1, την κυκλίνη E και την έκφραση της CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) και μπλοκάρει την φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστόματος (Rb), το οποίο μπορεί να είναι υπεύθυνο για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των EA.hy926 κυττάρων.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR-2 είναι σχετικά ειδική για τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα για την προώθηση της μετανάστευσης κατά την αγγειογένεση (347), η οποία επιβεβαιώνεται και από τη διαπίστωση ότι τα κύτταρα, με απενεργοποιημένο το γονίδιο VEGFR-2, εμποδίζουν του VEGF διέγερση της κυτταρικής μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού. Η αγγειογένεση χαρακτηρίζεται και από αγγειοδιαστολή, που διαμεσολαβείτε από NO και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στα προ- υπάρχοντα τριχοειδή ως απάντηση στον VEGF (348). Ο VEGF είναι ένας

σημαντικός διαμεσολαβητής των eNOS, που καταλύεται από την παραγωγή NO μέσω του υποδοχέα VEGFR-2 (349). Η αναστολή και η έκφραση των eNOS από το γαλλικό οξύ οδηγεί σε μία σημαντική μείωση της αγγειογένεσης (350). Συμπερασματικά, το γαλλικό οξύ αποτρέπει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και της αγγειογένεσης, αναστέλλοντας, ταυτοχρόνως, τον VEGF.

1.10 Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη, ριζώματα της *Curcuma longa* L. (οικογένεια Zingiberaceae), έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για αιώνες, στην ντόπια φαρμακευτική για να θεραπεύσει διάφορες καταστάσεις φλεγμονής και άλλες παθήσεις (351). Οι φαρμακευτικές της ιδιότητες οφείλονται, κυρίως, στα κουρκουμινοειδή, και το κύριο συστατικό, που είναι παρόν στα ριζώματα, συμπεριλαμβάνει την κουρκουμίνη (diferuloylmethane)- 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-hepadiene-3,5-dione). Με το πέρας των χρόνων, ένας αριθμός μελετών έχουν προσπαθήσει να αντιμετωπίσουν την φαρμακοκινητική της κουρκουμίνης, επειδή η ουσία αυτή απορροφάται ελάχιστα από το έντερο, μετά από πόσιμη χορήγηση, σε διαφορετικές δόσεις, της ³H-κουρκουμίνης σε αρουραίους(352, 353). Μελέτες έχουν δείξει ότι κατανάλωση από το στόμα της κουρκουμίνης από αρουραίους, οδήγησε στο να αποβάλλεται περίπου το 75% στα περιττώματα και στα ούρα βρέθηκαν μόνο ίχνη (354), ενώ η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση οδήγησε στο να αποβάλλεται ίδιο ποσοστό από τα περιττώματα, με μόνο 11% που βρέθηκε στη χολή (355), υποδηλώνοντας ελάχιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης από το έντερο. Μελέτες έχουν προτείνει την παρουσία διαφορετικών μεταβολιτών της κουρκουμίνης. Έχει δειχθεί ότι μετατρέπεται σε διυδροκουρκουμίνη και σε τετραυδροκουρκουμίνη. Μεταγενέστερα, αυτά τα προϊόντα μετατρέπονται μόνο σε γλυκουρονιδικές ουσίες (356). Σε μία άλλη μελέτη, έχει αναφερθεί ότι οι κύριοι μεταβολίτες της κουρκουμίνης στη χολή, είναι γλυκουρονιδικά παράγωγα της τετραυδροκουρκουμίνης (THC) και της εξαυδροκουρκουμίνης (355).



Εικόνα 12: Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη έχει δειχτεί ότι κατέχει μεγάλο εύρος φαρμακολογικής δράσης, συμπεριλαμβάνοντας την αντιφλεγμονώδη δράση (357, 358), την αντικαρκινική δράση (359), την αντιοξειδωτική δράση(360, 361), την επούλωση των πληγών (362) και την αντιμικροβιακή δράση(363). Πρόσφατα, θεραπεία με κουρκουμίνη έχει δειχτεί να διορθώνει ελαττώματα, που έχουν να κάνουν με την κυστική ίνωση (364).

In vivo και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της κουρκουμίνης να αναστέλλει την καρκινογένεση σε τρία στάδια: στην προώθηση του καρκίνου, στην αγγειογένεση και στην ανάπτυξη του όγκου. Η κουρκουμίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, που προκαλείται από μιτογόνα των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος, αναστέλλει την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και την μικτή αντίδραση λεμφοκυττάρων και, επίσης, αναστέλλει τον αυξητικό παράγοντα PDGF (platelet derived growth factor), ένας παράγοντας που εξαρτάται από κύτταρα του λείου μυός (365). Έχει αναφερθεί ότι είναι ένας μερικός αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης (366, 367). Το άλλο χαρακτηριστικό της κουρκουμίνης είναι ότι παρά το ότι καταναλώνεται κάθε μέρα για χρόνια στην Ασία δεν έχει δείξει να προκαλεί κάποια τοξικότητα (351).

1.10.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η κουρκουμίνη είναι μία λιπόφιλη πολυφαινόλη, που δεν διαλύεται σε νερό, αλλά σε οργανικούς διαλύτες, όπως η κετόνη και η αιθανόλη(368, 369). Η αντιοξειδωτική δράση των κουρκουμινοειδών προέρχεται από τη χημική τους δομή. Τα κουρκουμινοειδή αποτελούνται από δυο μεθοξυλιωμένες φαινόλες, που συνδέονται

από δύο α, και β ακόρεστες ομάδες καρβονυλίου, που υπάρχουν σε μία σταθερή ενολική μορφή (370). Η κουρκουμίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, συγκριτικά με την βιταμίνη C και E (361). Η κουρκουμίνη δείχνει να αναστέλλει την υπεροξειδωση λιπιδίων, χρησιμοποιώντας λινελαϊκό οξύ, ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, που μπορεί να οξειδωθεί και να δημιουργήσει μία ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέος. Εξάλλου, εκτός από την αναστολή της υπεροξειδωσης λιπιδίων, η κουρκουμίνη παρουσιάζει και μία δράση εξάλειψης ελευθέρων ριζών.

1.10.2 Αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης

Πρόσφατες μελέτες έχουν βρει ότι η κουρκουμίνη έχει μία δόσοεξαρτώμενη αντικαρκινική δράση σε μερικούς όγκους σε ζώα, συμπεριλαμβανομένου του όγκου του παχέος εντέρου, του δωδεκαδάκτυλου, του στομάχου, του οισοφάγου και του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη μειώνει τους όγκους που δημιουργούνται από βενζοπυρένιο, 7,12 διμεθυλοβενζανθρακένιο (371-373). Εκτός από το κάθετο αποτέλεσμα της κουρκουμίνης πάνω σε διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, τα ογκογονίδια, τις σηματοδοτηκές πρωτεΐνες, δρα σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης, από την αρχική προσβολή κυρίως της μεταλλάξεις του DNA μέσω της διαδικασίας της ογκογένεσης, της ανάπτυξης και της μετάστασης.

Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του εντέρου σε ινδούς οφείλεται στο ότι η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται στην ινδική κουζίνα (374). Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση για αυτά τα παράγωγα δείχνει να αλλάζει κάτω από διαφορετικές συνθήκες (370, 375). Συγκριτική δράση των κουρκουμινοειδών στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς MCF-7, έδειξε μία σημαντική μεταβολή της δράσης της, στην ανάπτυξη των κυττάρων(376). Δύο ανάλογα της κουρκουμίνης, η αρωματική ενόνη και η αρωματική διενόνη, έχουν πολύ καλή αντι-αγγειογενετική δράση (377). Επίσης, η κουρκουμίνη I, η II και η κουρκουμίνη III που απομονώνονται από το φυτό *C.longa*, συγκρίθηκαν για την κυτταροτοξική τους δράση, στη μείωση του όγκου και στην αντιοξειδωτική τους δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κουρκουμίνη III είναι η πιο τοξική ουσία και έδειξαν να αναστέλλουν τον όγκο Ehrlich ascites σε ποντίκια (378).

Χορήγηση κουρκουμίνης, κατά την περίοδο έναρξης και μετά την έναρξη του καρκίνου, έχει δείξει σημαντική αναστολή του όγκου παχέος εντέρου. Χορήγηση της συνθετικής κουρκουμίνης στην δίαιτα κατά το στάδιο ανάπτυξης, κατέστειλε τη συχνότητα και την πολλαπλότητα του μη επεμβατικού αδενοκαρκινώματος και, επίσης, ανέστειλε την πολλαπλότητα του επεμβατικού αδενοκαρκινώματος στο παχέος έντερο (379).

Η μοριακή βάση της αντικαρκινικής και χημειοπροληπτικής δράσης της κουρκουμίνης, οφείλεται στη δράση, που έχει σε αρκετούς στόχους, που περιλαμβάνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες, τους ρυθμιστές της ανάπτυξης, τα μόρια προσκόλλησης, τα γονίδια απόπτωσης, τους ρυθμιστές της αγγειογένεσης και τα σηματοδοτικά μόρια του κυττάρου(369). Η κουρκουμίνη μειоруθμίζει την παραγωγή της πρό-φλεγμονώδους κυτοκίνης του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- α), της IL-1 β (Interleukin-1 beta) και αναστέλλει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα (NF- κ B) και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης -1 (AP-1), που ρυθμίζει τα γονίδια για τους μεσολαβητές της προ-φλεγμονής και των προστατευτικών αντιοξειδωτικών γονιδίων (380, 381). Η έκφραση του NF- κ B συμπεριλαμβάνεται στην αντίδραση του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως οι κυτταροκίνες, η UV ακτινοβολία, οι ελεύθερες ρίζες, η υποξία κατάσταση, και τα λοιμώδη αντιγόνα (382-384). Σε πολλούς καρκίνους έχουμε αυξημένη ενεργοποίηση του NF- κ B, που συνδέεται με διάφορα στάδια της ανάπτυξης της κακοήθειας, όπως η έκφραση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, της αγγειογένεσης, της ανάπτυξης του όγκου και της μετάστασης(385). Ο παράγοντας NF- κ B είναι μία πρωτεΐνη, που αποτελείται από 5 υπομονάδες. Το σύμπλοκο διατηρείται στο κυτταρόπλασμα σε μία ανενεργή μορφή από τον I- κ B (αναστολέας του NF- κ B). Η κουρκουμίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF- κ B, μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση του I- κ B (371), μέσω της αδρανοποίησης του I- κ B συμπλόκου κινάσης (386). Η ανασταλτική δράση της κουρκουμίνης στο NF- κ B μονοπάτι, είναι κεντρικής σημασίας για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της ουσίας. Έχει αναφερθεί, επίσης, η καταστολή της δράσης ενός αριθμού ενζύμων, όπως του κυτοχρώματος P450 και της COX-2. Άλλες μελέτες έχουν προσδιορίσει τη μείωση της ακτινοβολίας, που επάγει την καταστροφή του DNA σε λεμφοκύτταρα αρουραίων (387), καθώς και τη δυνατότητα της κουρκουμίνης ενάντια της μετάλλαξης (388). Η κουρκουμίνη έχει την ικανότητα να καταστέλλει την ακτινοβολία UV, που επάγει

τη μετάλλαξη του DNA, και μετέπειτα επάγονται οι λειτουργίες, που ενεργοποιούνται σε κίνδυνο από τα κύτταρα (389). Η κουρκουμίνη, επίσης, επηρεάζει τα ένζυμα της φάσης I και φάσης II του ηπατικού κυτοχρώματος P450, το σύστημα ενζύμων, που συμπεριλαμβάνεται στην οξείδωση και στην αποτοξίνωση τοξικών ουσιών. Η κουρκουμίνη αναστέλλει ένζυμα της φάσης I (που περιλαμβάνουν τις ισομορφές του κυτοχρώματος P450 και P450 ρεδουκτάσης), τα οποία επάγονται ως απόκριση σε έκθεση σε τοξίνες και δημιουργούν ένα δέκτη καρκινογόνων μεταβολιτών, που συμβάλλουν στη δημιουργία DNA συμπλόκων κατά την οξείδωση τέτοιων ουσιών (390). Η κουρκουμίνη επάγει τα ένζυμα της φάσης II, που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση των τοξικών μεταβολιτών (συμπεριλαμβανομένων της S-τρανσφεράσης γλουταθειόνης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης) (391).

Οι βασικοί ρυθμιστές, που συμπεριλαμβάνονται στην απόπτωση, έχουν χαρακτηριστεί πολύ καλά και περιλαμβάνουν τις κασπάσες, την οικογένεια Bcl-2, την οικογένεια του υποδοχέα TNF, και άλλες προσαρμοσμένες πρωτεΐνες (392). Ο καρκίνος του προστάτη ο οποίος εξαρτάται από ανδρογόνα, υφίσταται απόπτωση σε περίπτωση αφαίρεσης ανδρογόνων, και σε έκφραση της Bcl-2 και των κασπασών που συσχετίζονται με κύτταρα του προστάτη τα οποία είναι ευαίσθητα στη θεραπεία. Η κουρκουμίνη έχει δείξει να επάγει την απόπτωση σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (393). Η θεραπεία με κουρκουμίνη καταστέλλει την βασική ενεργοποίηση του NF-κΒ και της AP-1 στην κυτταρική σειρά DU145, και μειώνει την ρύθμιση των ενδογενών bcl-2 και bax_{κλ} (394). Η κουρκουμίνη, σε συνδυασμό με τον TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), επάγει το θάνατο στα LNCaP κύτταρα (395). Μελέτες, που χρησιμοποίησαν κύτταρα χωρίς την πρωτεΐνη p53, καθιέρωσαν τη συμμετοχή της p53 στην επαγωγή της απόπτωσης από την κουρκουμίνη (396). Ωστόσο, σε κύτταρα μελανώματος, η απόπτωση επάγεται από ένα μονοπάτι, μέσω του FAS (receptor/carsae-8) και έτσι, είναι ανεξάρτητη από την p53 (397). Έχει, επίσης, δειχθεί να επηρεάζει τη δράση ενός αριθμού ενζύμων, όπως η κυκλοοξυγενάση (398), η πρωτεϊνική κινάση C (366) και η πρωτεϊνική τυροσινική κινάση (399). Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι η κουρκουμίνη επηρεάζει το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση του κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης (cPLA(2)) και ελαττώνοντας την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2(COX-2). Επιπλέον, αναστέλλει την

καταλυτική δράση της 5-λιποξυγενάσης (LOX) (400). Οι δραστηριότητες αυτές μπορεί να συμβάλουν στην αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης, και των αναλογών της (400). Αυξημένες δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών και των ενζύμων της φάσης II από την κουρκουμίνη σε ποντίκια, έχουν προταθεί ως μηχανισμοί χημειοπροφύλαξης από τον καρκίνο, που συνδέονται με αυτήν (391).

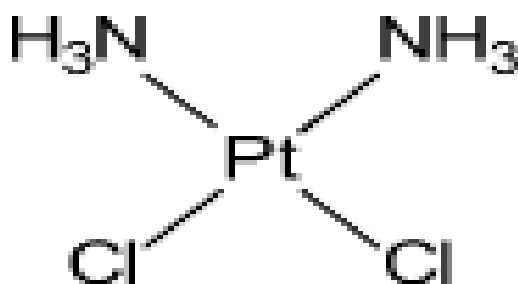
Διαταραχές στο ρυθμιστικό έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μπορεί να οδηγούν στο σχηματισμό καρκινικών κυττάρων, στα οποία η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός προχωρά ανεξέλεγκτα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1, η οποία έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη καρκίνων, που περιλαμβάνουν αιματολογικές κακοήθειες και διάφορους συμπαγείς καρκίνους(401). Η κουρκουμίνη καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1 σε πολλά είδη καρκίνων. Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια της απόπτωσης, το εσωτερικό (μιτοχονδριακό) μονοπάτι και το εξωτερικό (μέσω υποδοχέων θανάτου) μονοπάτι. Το εσωτερικό μονοπάτι συμπεριλαμβάνει την λειτουργία της p53 ως μεταγραφικού παράγοντα αυξορύθμισης της έκφρασης της Bax. Η Bax είναι μία προ-αποπτωτική πρωτεΐνη, που ανταγωνίζεται τη Bcl-2, η οποία είναι μία άντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, που είναι παρούσα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Όταν η αναλογία των Bax/Bcl-2 αυξάνεται, η προστατευτική δράση της Bcl-2 στη μιτοχονδριακή μεμβράνη διακόπτεται και η διαπερατότητα αυξάνεται, επιτρέποντας στο κυτόχρωμα c να απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο. Το κυτόχρωμα c δεσμεύεται στον Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1), για να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο απόπτωσης, το οποίο ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών, μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης- 9 και οδηγεί σε θάνατο του κυττάρου, μέσω της καταστροφής των ενζύμων, των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και του DNA (402). Η κουρκουμίνη έχει δείξει ότι επάγει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα στη G2 φάση, μέσω της αυξορύθμισης της έκφρασης της p53 και της εκκίνησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης, μέσω της αύξησης της έκφρασης της Bax και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c (396, 402, 403).

1.11 Σισπλατίνη

1.11.1 Ιστορική αναδρομή

Η ανακάλυψη της σισπλατίνης (CDDP) ως αντικαρκινογόνου φαρμάκου το 1960 άνοιξε μία καινούργια εποχή στη θεραπεία του καρκίνου (404). Η σύνθεση της έγινε για πρώτη φορά 100 χρόνια νωρίτερα, το 1845, και το 1893 ο Alfred Werner κατέληξε στη δομή της CDDP (405). Το 1960 ο Rosenberg και οι συνάδελφοι του ανακάλυψαν ότι η ηλεκτρόλυση ενός ηλεκτροδίου πλατίνας έδωσε ως αποτέλεσμα την παραγωγή σισπλατίνης. Αργότερα, η ίδια ομάδα δοκίμασε με επιτυχία τη δράση μερικών συμπλόκων πλατίνας σε σαρκώματα αρουραίων (406).

Το 1971, η CDDP εφαρμόστηκε σε ασθενείς με καρκίνο (407) για πρώτη φορά. Έγινε διαθέσιμη για κλινική χρήση το 1978, ως Platinol® (Bristol-Myers Squibb). Η CDDP έδειξε αντικαρκινική δράση υψηλού επιπέδου και ευρέος φάσματος και επομένως αναπτύχθηκε εκτεταμένη έρευνα στον τομέα του σχεδιασμού των φαρμάκων για να βρεθούν νέα είδη μετάλλων, που δεν περιέχουν πλατίνη με μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση και λιγότερες παρενέργειες (404, 407, 408). Η CDDP έχει κλινικό όφελος για διάφορους τύπους συμπαγών όγκων, ωστόσο η αποτελεσματικότητα της CDDP συχνά συνοδεύεται από τοξικές παρενέργειες και αντίσταση του καρκίνου στην θεραπεία, το οποίο οδηγεί σε δευτερογενείς κακοήθειες(404).



Εικόνα 13: Σισπλατίνη

1.11.2 Η πλατίνη στην βοηθητική θεραπεία του καρκίνου και παρενέργειες

Κλινικά, τα σύμπλοκα πλατίνης χρησιμοποιούνται ως βοηθητική θεραπεία κατά του καρκίνου. Ο στόχος της αντικαρκινικής θεραπείας είναι να επάγουν το θάνατο

καρκινικών κυττάρων. Η CDDP (πλατίνη) είναι ένα από τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα σύμπλοκα και έχει αποτέλεσμα σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων κακοηθειών (409, 410). Οι ενώσεις πλατίνης χρησιμοποιούνται στην θεραπεία συγκεκριμένων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων αυτού των όρχεων, της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου, του μικροκυτταρικού και μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού, της τραχήλου της μήτρας, του στομάχου και του προστάτη, όπως στα λεμφώματα Hodgkin και μη Hodgkin, των σαρκωμάτων, του πολλαπλού μυελόματος, του μελανώματος και του μεσοθηλιώματος.

Παρά τη θετική δράση ενώσεων πλατίνας, αυτά είναι δηλητήρια. Οι ασθενείς, που λαμβάνουν αυτές τις ενώσεις, εμφανίζουν παρενέργειες, οπότε αυτό περιορίζει και την δόση, που χορηγείται. Η ικανότητα να διαχειρισθεί αυτή η τοξικότητα, που προκαλείται, είναι κρίσιμη για την επιτυχία της χημειοθεραπείας.

Οι παρενέργειες της θεραπείας με πλατίνη περιλαμβάνουν μια γενική βλάβη των κυττάρων, μειωμένη παραγωγή κυττάρων του αίματος και αιμοπεταλίων στο μυελό των οστών (μυελοκαταστολή), μειωμένη απάντηση στις λοιμώξεις (ανοσοκαταστολή), όπως και αναγούλες και εμετοί. Πιο συγκεκριμένες παρενέργειες περιλαμβάνουν βλάβη στο νεφρό (νεφροτοξικότητα), βλάβη στους νευρώνες (νευροτοξικότητα) και απώλεια ακοής (405, 410-413). Βασικές αρχές της διαχείρισης και στρατηγικές περιλαμβάνουν την προστασία του νεφρού και την ενίσχυση αποβολής του φαρμάκου, με ενδοφλέβια ενυδάτωση με την επιλογή ενός οσμωτικού διουρητικού, ενώ είναι απαραίτητη η αποφυγή νεφροτοξικών φαρμάκων. Το θειοθειικό νάτριο και πλασμαφαίρεση, με η χωρίς υποστήριξη αιμοκάθαρσης, θεωρούνται ως ελεγκτές των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων. Επιπλέον, η εφαρμογή και οι πρόσθετες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των αντιεμετικών, είναι απαραίτητα (413).

Επειδή, οι τοξικότητες, σχετιζόμενες με τη σισπλατίνη είναι δοσο-εξαρτώμενες, μία μεγάλη δόση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα σημαντική νοσηρότητα ή/και θάνατο, ενώ οι επιπτώσεις της υπερβολικής δόσης της σισπλατίνης παραμένουν άγνωστες.

Η CDDP χρησιμοποιείται για θεραπεία και στην παιδιατρική, για τους συμπαγείς όγκους. Ένας σημαντικός περιορισμός στις δόσεις στα παιδιά είναι η απώλεια της ακοής (413). Υπάρχει όμως μία διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα, επειδή δεν συμβαίνει σε όλους τους ασθενείς και στις περιπτώσεις, που αυτοί έχουν παρόμοια θεραπεία (414). Ο

Rademaker- Lakhaί και η ομάδα του έδειξαν ότι η τοξικότητα για το ακουστικό συνδέεται με τις τακτικές δόσης χημειοθεραπευτικών όσο και με πρόγραμμα χημειοθεραπείας σισπλατίνης και gemcitabine σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Η απώλεια ακοής συμβαίνει, κυρίως, σε υψηλές συχνότητες και είναι πιο έντονη όταν η σισπλατίνη δίνεται μια φορά κάθε δεύτερη βδομάδα (415). Επιπλέον, υπάρχει ανάγκη για ωτοπροστατευτικά φάρμακα, τα οποία μπορεί να δίνονται χωρίς να επηρεάσουν τη θεραπεία του καρκίνου (416).

Η CDDP είναι νεφροτοξική (417). Πρόσφατες αποδείξεις υποστηρίζουν το ρόλο της CDDP για μία φλεγμονώδη παθογένεση με τα T λεμφοκύτταρα ως άμεσοι διαμεσολαβητές της (πειραματικής) CDDP νεφροτοξικότητας. Η στόχευση των T λεμφοκυττάρων μπορεί να μειώσει τις παρενέργειες όταν η CDDP χορηγείται σε ασθενείς (418). Σε αρουραίους, η CDDP επάγει οξεία νεφρική ανεπάρκεια και μειωμένη ρύθμιση του ηπατικού κυτοχρώματος P450 (419).

Η θεραπεία με CDDP έχει συσχετιστεί με καρδιοτοξικότητα. Η αντινεοπλασματική χημειοθεραπεία με CDDP μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, όπως ένα παρατεταμένο διάστημα QT, καθώς και εμετούς διαφορετικού βαθμού. Μια εφαρμογή με αντιεμετικά δεν συνίσταται, επειδή θα μπορούσε να συμβεί συνεργική δράση στο QT διάστημα. Επομένως, η γνώση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι ζωτικής σημασίας για τη μείωση του κινδύνου, όπως για παράδειγμα, σε εκθέση ιδιαίτερα ευάλωτων ατόμων, όπως αυτοί με το γενετικό σύνδρομο του παρατεταμένου QT, σε θεραπεία με CDDP (420).

Λιγότερη σημασία έχει δοθεί στην ηπατοτοξικότητα. Για αυτό και η CDDP, σπάνια, έχει χαρακτηριστεί ως ηπατοτοξική. Σε αρουραίους, η CDDP αυξάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και αλλάζει την κατάσταση θειολών στον ιστό, με ταυτόχρονες αλλοιώσεις στα ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης και της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης μειώνονται σημαντικά μετά τη θεραπεία με CDDP, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η γ- γλουταμυλική τρανσπεπτιδάση και η καταλάση δείχνουν μία σημαντική αύξηση. Παρόλα αυτά, η δραστηριότητα της S-τρανσφοράσης της γλουταθειόνης δεν αλλάζει από τη CDDP. Η θεραπεία με CDDP, επίσης, αυξάνει τα επίπεδα του κυτοχρώματος P450, ενώ το κυτόχρωμα b(5) μειώνεται.

Έτσι, η μεταβολή στην κατάσταση των αντιοξειδωτικών ενζύμων με αύξηση στην υπεροξειδωση λιπιδίων, δείχνει ότι αυτά τα ένζυμα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (421).

Προκειμένου να ξεπεραστούν οι παρενέργειες της CDDP, όπως η ανθεκτικότητα στο φάρμακο και η κακή στοματική βιοδιαθεσιμότητα, απαιτείται η ανάπτυξη φαρμάκων, που βασίζονται στην πλατίνα, όπως η καρβοπλατίνη, η οξαλιπλατίνη, η σατραπλατίνη, η πικοπλατίνη και το πολυπύρρηνο σύμπλοκο πλατίνας BBR3464 (triplatin) (405, 408, 410). Παρόλο που τα προ κλινικά *in vivo* και *in vitro* αποτελέσματα, τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών των νέων ενώσεων πλατίνης παραμένουν ακόμα μία προσδοκία. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν την πιθανή ενεργοποίηση των 'ενεργών μορίων', που παράγονται *in vivo*, καθώς και την πρόσληψη, την αποτελεσματική εκροή, την ενδοκυτταρική μεταφορά και άλλους πιθανούς μηχανισμούς, που εμπλέκονται εσωτερικά καθώς και την απόκτηση χημειοανθεκτικότητας σε *in vivo* θεραπεία με πλατίνη, συμπεριλαμβάνοντας την ανεπαρκή διάχυση των ιστών του όγκου, που μπορεί να αποτελούν ένα περιοριστικό βήμα στη θεραπεία των συμπαγών καρκίνων με ενώσεις πλατίνης.

1.11.3 Κυτταρική δραστηριότητα των ενώσεων πλατίνης

Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες της ιατρικής έχουν επικεντρωθεί στο να διευκρινιστεί ο βασικός μηχανισμός του καρκίνου. Η ανάπτυξη νέων τεχνικών, που ταυτοποιούν διαταραχές της κυτταρικής λειτουργίας οδήγησε σε μία αυξημένη γνώση των μοριακών, των φυσιολογικών και των παθολογικών μηχανισμών του καρκίνου. Πριν κατανοηθεί ο μηχανισμός του καρκίνου, οι χημειοθεραπευτικές ενώσεις ανακαλύφθηκαν εμπειρικά, κυρίως αναστέλλοντας μεταβολικά μονοπάτια, απαραίτητα για την κυτταρική διαίρεση (π.χ. μέσω βλάβης του DNA). Ωστόσο καμία από αυτές τις αντικαρκινικές στρατηγικές δεν είναι συγκεκριμένη και ειδική για τον καρκίνο (405). Παρόλα αυτά, οι καρκίνοι είναι περίπλοκοι. Διαφορετικοί καρκίνοι έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, οπότε είναι αδύνατον να βρεθεί μία θεραπεία για όλους τους καρκίνους, στοχεύοντας μόνο ένα προϊόν ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή μόνο ένα μονοπάτι, που χρειάζεται για την ανάπτυξη του καρκίνου(422). Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα είναι μη αποπτωτικά (423) και η χημειοθεραπεία επηρεάζει τα

φυσιολογικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, όπως και τα καρκινικά κύτταρα (423). Χρειάζεται καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών πίσω από την διαμόρφωση των κυτταρικών αποκρίσεων για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη χρήση της CDDP (424).

Μοριακές και γενετικές προσεγγίσεις έχουν ενισχύσει την κατανόηση της βιολογίας του κυττάρου και έχουν αποκαλύψει νέα δίκτυα σηματοδότησης, που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Μερικά από αυτά τα μονοπάτια μεταβάλλονται στα καρκινικά κύτταρα. Οι ενώσεις πλατίνας βλάπτουν τον όγκο, επάγοντας την απόπτωση, που προκαλείται από την ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Αυτό το αποτέλεσμα έχει συνδεθεί με την αναστολή της σύνθεσης του DNA και με την επιδιόρθωση, που θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1,S, ή G2-M, οπότε επάγεται η απόπτωση.

1.11.3.1 Ενεργές μορφές οξυγόνου

Η έκθεση στο οξειδωτικό στρες μπορεί να διακόψει φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες. Εκτός από την καταστροφή του DNA πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η CDDP, επίσης, επάγει τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), που προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος συμβαίνει κατά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση μερικών μονοπατιών σηματοδότησης, ενώ μερικά μονοπάτια εξαρτώνται από το (καρκινικό) κύτταρο. Ο σχηματισμός των ROS εξαρτάται από την συγκέντρωση της CDDP και τη διάρκεια της έκθεσης(424). Η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση διατηρείται από ομάδες θειόλης (-SH) που περιέχουν τα μόρια. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μία ομάδα θειόλης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών θειόλης, που από την πλευρά τους μπορεί να αλληλεπιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και ως εκ τούτου, να επάγουν σχηματισμό των ROS (405).

Πολλά μέταλλα είναι σε θέση να δημιουργούν ROS. Μερικές βλάβες του DNA διαμεσολαβούνται από μέταλλα, που επάγουν τις ελεύθερες ρίζες, και ,επιπλέον, τα μέταλλα αναστέλλουν την επιδιόρθωση του DNA. Πολλαπλοί μηχανισμοί οδηγούν στην αναστολή της επιδιόρθωσης (α) κατευθείαν από ελεύθερες ρίζες αντικατάσταση ψευδαργύρου στην περιοχή δακτυλίου ψευδάργυρου ή (b) έμμεσα, από μείωση του

επιπέδου της μειωμένης γλουταθειόνης (405). Αυτό, εν μέρει, μπορεί να εξηγεί το παράδοξο ότι οι ROS μπορεί να είναι καρκινογόνες, μα και χρήσιμες για την θεραπεία του καρκίνου. Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα μπορεί να συμβούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνο έκθεσης. Τα μέταλλα σε συγκεντρώσεις, που υπερβαίνουν κάποια φυσιολογικά επίπεδα, είναι τοξικά, πιθανότατα μέσω της ενεργοποίησης ελευθέρων ριζών. Συνήθως, κάθε κύτταρο έχει μία ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και ελευθέρων ριζών. Ενώ οι ROS μπορεί να καταβάλλουν τη μείωση των ικανοτήτων του κυττάρου, επάγουν την υπεροξείδωση λιπιδίων, τη μείωση των σουλφυδρυλικών ομάδων, τη μεταβολή των μονοπατιών μεταγωγής σήματος, την ομοιόσταση ασβεστίου και τη βλάβη στο DNA. Επομένως, αυτό οδηγεί σε γήρανση ή και σε καρκίνο (405).

Πρόσφατες μελέτες, επίσης υπογραμμίζουν την σημαντικότητα της CDDP στην επαγωγή των ROS *in vitro*. Παρόμοια στοιχεία δεν είναι ακόμη, διαθέσιμα για ιστούς με όγκους πρώτου βαθμού. Κάποιες αναφορές δείχνουν ότι η CDDP επάγει τη δημιουργία των ROS *in vivo*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις παρενέργειες της θεραπείας με CDDP, συμπεριλαμβανομένων της νεφροτοξικότητας και της υπατοτοξικότητας, που μειώνονται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Παρόλα αυτά, η κατανόηση της έκφρασης των προ- και αντι- αποπτωτικών πρωτεϊνών και η σχέση τους με το σύστημα οξειδωαναγωγής στο κύτταρο, όπως η τοποθεσία της παραγωγής των ROS μετά από θεραπεία με CDDP, θα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σε νέες προσεγγίσεις για την πρόληψη των παρενεργειών από CDDP, χωρίς να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα της (424).

1.11.3.2 Αλληλεπίδραση με το DNA. Βλάβη DNA και μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Η CDDP έχει θεωρηθεί ως το αντικαρκινικό φάρμακο, που δημιουργεί βλάβη στο DNA, δημιουργώντας διαφορετικά είδη δυσλειτουργικών προσαγωγών με το κυτταρικό DNA (424-426), ενώ το γονίδιο XRCC1 μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στην απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία, που βασίζεται στην πλατίνη(427). Η σισπλατίνη και η οξαλιπλατίνη είναι δομικά διαφορετικά, αλλά αποτελούν παρόμοια προϊόντα προσθήκης στις ίδιες θέσεις στο DNA (428-430). Τέτοια παράγωγα αναγνωρίζονται από κυτταρικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η αντιστοιχία πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και κάποιες πρωτεΐνες αναγνώρισης της βλάβης συνδέονται στα παράγωγα σισπλατίνης –GG, με

μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τα παράγωγα οξαλιπλατίνη –GG. Αυτή η διαφορετική αναγνώριση των παραγώγων τις σισπλατίνης και οξαλιπλατίνης – GG συμβάλουν στη διαφορετική κυτταροτοξικότητα, και στο εύρος του όγκου της CDDP και οξαλιπλατίνης(428). Παρόλα αυτά, μπορεί να υπάρχουν σημαντικές διαφορές διαμόρφωσης μεταξύ των παραγώγων, ακόμη και αν η κρυσταλλική δομή της CDDP και οξαλιπλατίνης – GG είναι ίδια π.χ η σισπλατίνη θα μπορούσε να προκαλέσει διακοπή της κυτταρικής δραστηριότητας μέσω της σύνδεσής της, σε μία πιο ευαίσθητη περιοχή του γονιδιώματος, όπως οι τελομεράσες (426). Από την άλλη, υπάρχει η πιθανότητα ότι τα φάρμακα πλατίνης μπορεί να αλληλεπιδρούν κατευθείαν με ελεύθερες βάσεις νουκλεοτιδίων πριν την ενσωμάτωσή τους στο DNA (431).

Η μελέτη νέων ενεργών φαρμάκων πλατίνης έχει επικεντρωθεί σε σύμπλοκα με γεωμετρία cis-, επειδή η τρανσπλατίνη, το trans-ισομερές της σισπλατίνης, είναι ανενεργό. Η ανενεργότητα της trans-πλατίνης είναι αποτέλεσμα κινητικής αστάθειας, προωθώντας την απενεργοποίηση της και το σχηματισμό DNA παραγώγων, που χαρακτηρίζονται από επιλεκτικότητα περιοχής και μια στερεοχημεία, διαφορετική από την σισπλατίνης. Ως εκ τούτου, εικάζεται ότι η παρουσία δυο ομάδων στην θέση cis-είναι απαραίτητη για την αντικαρκινική δραστηριότητα των συμπλόκων πλατίνης (432). Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες εξαιρέσεις: η αντικατάσταση του υποκατάστατη αμίνης της trans-πλατίνης από ετεροκυκλικό αρωματικό δότη N, οδηγεί σε αλειφατικές αμίνες, στις οποίες η ένωση οφείλει την ιδιότητα της στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, ενώ ήταν και δραστικές έναντι σε ανθεκτικά σε σισπλατίνη καρκινικά κύτταρα (432). Η δημιουργία των DNA παραγώγων, που είναι ποιοτικά και ποσοτικά διαφορετικά από τη CDDP, υποστηρίζει την υπόθεση ότι τα ενεργά αντικαρκινικά σύμπλοκα trans-πλατίνης μπορεί να έχουν διαφορετικό φάσμα δραστηριότητας (432).

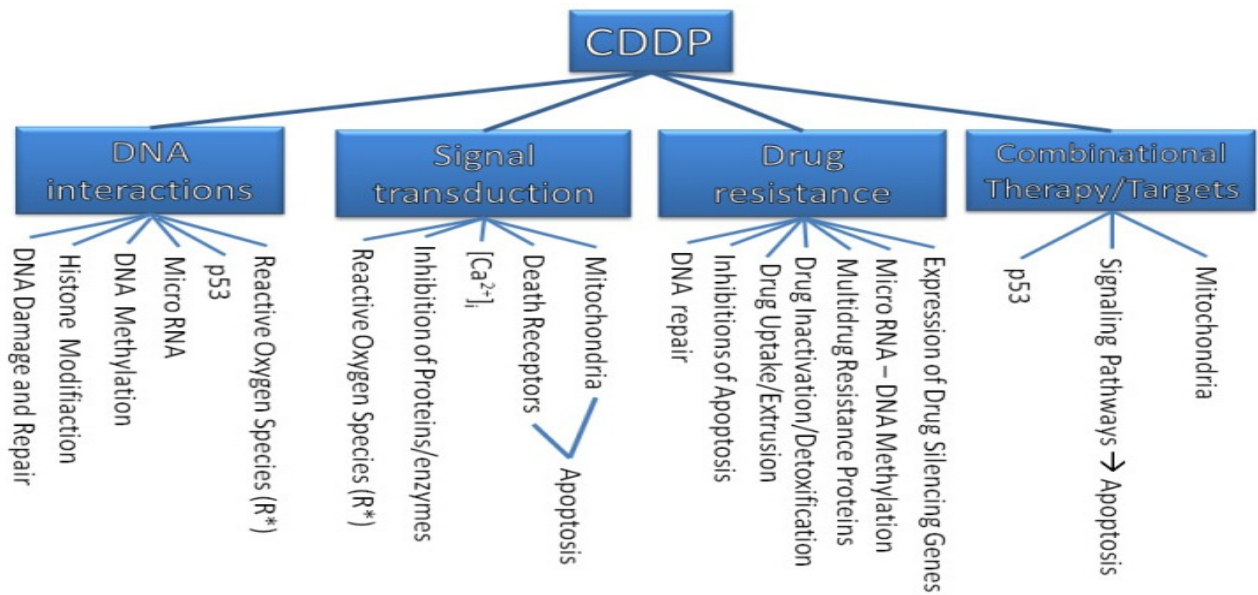
Η οξαλιπλατίνη είναι ένα σύμπλοκο πλατίνης τρίτης γενιάς, που έχει δείξει να έχει *in vivo* και *in vitro* αντικαρκινική δράση. Από την άλλη μεριά, έχει μια καλύτερη ασφάλεια, συγκριτικά με τη CDDP και καμία διασταυρούμενη αντίσταση, συγκριτικά με τη CDDP και την καρβοπλατίνη. Η οξαλιπλατίνη έχει ένα διάμινο κυκλοεξανικό υποκαταστάτη, που δεν υδρολύεται, και διατηρείται στους τελικούς μεταβολίτες κυτταροτοξικότητας του

φαρμάκου (433). Όπως η CDDP, η οξαλιπλατίνη στοχεύει το DNA, παράγοντας κυρίως 1,2- GG. Οι κυτταρικές και οι μοριακές πτυχές του μηχανισμού δράσης της οξαλιπλατίνης δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Παρόλα αυτά, η επιδιόρθωση αντιστοιχίας και η παράκαμψη αντιγραφής φαίνεται να είναι οι εμπλεκόμενες διαδικασίες στη διαφοροποίηση των μοριακών αποκρίσεων σε αυτούς τους παράγοντες (433).

1.11.3.3 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Η ανάπτυξη του κυττάρου και ο πολλαπλασιασμός είναι εξαιρετικά οργανωμένες διαδικασίες σε ένα κανονικό κύτταρο, και διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο μπορεί να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και να συμβάλλουν σε έναν κακοήθη φαινότυπο του καρκινικού κυττάρου. Ο κυτταρικός κύκλος των θηλαστικών αποτελείται από τέσσερα στάδια, τις G1, S, G2 και M, με τη G1 και τη G2 να αναφέρονται ως οι φάσεις «χάσμα» μεταξύ της σύνθεσης του DNA και της μίτωσης (434). Επιπλέον, υπάρχει και μία πέμπτη φάση που αναφέρεται ως G0, η οποία παρουσιάζει μια κατάσταση ηρεμίας, έξω από τον κυτταρικό κύκλο, στον οποίο τα κύτταρα δεν είναι ενεργά διαιρούμενα ή προετοιμάζονται για διαίρεση. Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω της συντονισμένης αλληλεπίδρασης των αντίστοιχων κυκλινών, που εξαρτώνται από τις κινάσες (CDKs), για να σχηματίσουν ενεργά σύμπλοκα και να οδηγήσουν τα κύτταρα στην επόμενη φάση την κατάλληλη στιγμή. Η ρύθμιση των σημείων ελέγχου μεσολαβείτε από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, και χρησιμεύει για να ελέγχει με ακρίβεια γεγονότα ζωτικής σημασίας, όπως ο πολλαπλασιασμός του DNA, και η απομόνωση χρωμοσωμάτων, και μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, για να επιτραπεί η διόρθωση, εάν παρατηρούνται λάθη(435). Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο κυκλίνης/CDK ρυθμίζει διάφορα σημεία του κυτταρικού κύκλου και το ίδιο αυτό σύμπλοκο γίνεται υπόστρωμα για άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, με τα πιο ρυθμιζόμενα σημεία να είναι οι μεταβάσεις από τη φάση G1/S και G2/M. Η κυκλίνη της D οικογένειας με τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα CDK4 και CDK6 προωθούν την εξέλιξη μέσω της G1, το σύμπλοκο κυκλίνης E/CDK2 επάγει την είσοδο στην φάση S, η κυκλίνη A/CDK2 επάγει την εξέλιξη της φάσης G2 και η κυκλίνη B/CDK1 ενεργοποιεί την είσοδο στην μιτωτική φάση (436).

Η σισπλατίνη επάγει τη βλάβη στο DNA, ενεργοποιεί έναν αριθμό μονοπατιών, πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται από αρκετές έρευνες. Ένα από αυτά τα μονοπάτια κορυφώνεται με την ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που χρονικά επάγει μια παροδική αναστολή στην φάση S, που ακολουθείται από την αναστολή της Cdc2-κυκλίνης A ή της B κινάσης, για να επηρεάζουν μια σταθερή G2/M αναστολή (437, 438). Δεδομένου ότι η ανασταλτική επίδραση των προϊόντων DNA (adduct), που προστίθενται στην σισπλατίνη στην G1 φάση κινασών και εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs), είναι ένα μεταγενέστερο γεγονός στην ενεργοποίηση σημείων ελέγχου, παρατηρείται πιο σπάνια συσσώρευση των κυττάρων στην φάση G1. Σε μεγάλο βαθμό, τα κύτταρα παραμένουν παγιδευμένα στην G2/M φάση. Η σχέση μεταξύ της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της κυτταροτοξικότητας είναι περίπλοκος και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να είναι μια αναστολή στην κυτταροτοξική διαδικασία, η οποία είναι ένα αποτέλεσμα, που προέρχεται, κατά κύριο λόγο, από την ένδειξη ότι η φαρμακολογική κατάργηση των σημείων ελέγχου G2/M, αυξάνει την κυτταρική ευαισθησία στη σισπλατίνη (439, 440). Αυτό είναι σταθερό, με την έννοια ότι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η οποία είναι γενικώς αποδεκτή ως συνέπεια της βλάβης του DNA, είναι απαραίτητη για να ενεργοποιεί το σύμπλοκο επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER), να αφαιρεί προσθήκες και να επάγει την επιβίωση των κυττάρων. Μόνο όταν η επιδιόρθωση είναι ατελής, όπως θα συνέβαινε στην περίπτωση, που η βλάβη είναι εκτεταμένη, τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση. Έτσι, η επιδιόρθωση είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου και την απόπτωση, και είναι ενδιαφέρον, πως και οι τρεις διαδικασίες είναι συνδεδεμένες με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (441, 442). Είναι εμφανές ότι η κατανόηση μοριακών και κυτταρικών αποκρίσεων στη βλάβη του DNA, έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια, αλλά παραμένουν πολλά ερωτήματα, συμπεριλαμβάνοντας το πως η p53 καταλαβαίνει την εκτομή του DNA, την καταστροφή και την επιδιόρθωση του, οπότε καθορίζει πότε να επιτρέπει στο κύτταρο να επιβιώσει ή να ενεργοποιεί το αποπτωτικό σύστημα.



Εικόνα 14: Οι στόχοι της σισπλατίνης

1.11.4 Η ανθεκτικότητα στη σισπλατίνη και η p53

Ένα από τα κύρια μονοπάτια, που ρυθμίζει την επιβίωση των κυττάρων, ακολουθώντας τη βλάβη του DNA, είναι το μονοπάτι της p53 (443). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη του πυρήνα, που εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην απόπτωση. Ως εκ τούτου, η p53 είναι ένας μεσολαβητής της κυτταρικής απόκρισης κατά των γεντοξικών (genotoxic) προσβολών (444) και ασκεί τη δράση της, μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής. Κατά την έκθεση σε γεντοξικές ενώσεις, τα επίπεδα της p53 αυξάνονται, εξαιτίας διάφορων μέτα-μεταγραφικών μηχανισμών. Είναι ενδιαφέρον ότι η πλατίνη επάγει τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 στην κυτταρική σειρά A2780, τα οποία είναι καρκινικά κύτταρα των ωθηκών, ευαίσθητα στη σισπλατίνη, ενώ είναι σημαντικά λιγότερο έντονη στην πιο ανθεκτική σειρά CP70 (445). Αυτό το αποτέλεσμα είναι συνεπές και με την παρατήρηση ότι απενεργοποίηση της λειτουργίας της άγριου τύπου p53 στα A2780 κυτταρική σειρά καρκίνου της ωθήκης, που πραγματοποιείται με επιμόλυνση με HPV-16 E6 (μια πρωτεΐνη που προσδέεται στη p53 και την στοχεύει για απενεργοποίηση) αυξάνει την ευαισθησία στη σισπλατίνη και μειώνει την επιδιόρθωση του συμπλόκου σισπλατίνης- DNA (446). Έτσι, η ανθεκτικότητα στη σισπλατίνη συσχετίζεται με την παρατεταμένη συσσώρευση άγριου τύπου της p53 πρωτεΐνης, και

ταυτόχρονα με ενισχυμένη επιδιόρθωση του DNA. Η p53 μπορεί να παίξει διπλό ρόλο μετά από έκθεση σε κυτταροτοξική θεραπεία, είτε ενεργοποιώντας μηχανισμούς, που επάγουν την απόπτωση, είτε επάγοντας διαδικασίες, που κατευθύνουν την επιδιόρθωση του DNA και την επιβίωση του κυττάρου(447-449). Με άλλα λόγια, η p53 είναι βασικό συστατικό για την επιδιόρθωση του DNA, παίζοντας έναν άμεσο ρόλο στην αποκατάσταση των βλαβών του DNA (450). Ένα ενδιαφέρον σενάριο για το μηχανισμό, με τον οποίο η σισπλατίνη ρυθμίζει το βιολογικό αποτέλεσμα της p53, μπορεί να είναι η αναγνώριση της δέσμευσης σισπλατίνης με το DNA από το NER, το σύστημα που διαμεσολαβεί στη διαδικασία μεταγωγής σήματος, καταλήγοντας στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της p53 και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, που επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA, ενισχύοντας την ανθεκτικότητα σε αυτό το μεταλλοφάρμακο (427). Η βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης p53 συνδέεται στενά με τη δράση της να δεσμεύεται ειδικά στην ακολουθία του DNA. Η ενεργή p53 δεσμεύεται ως ένα τετραμερές με φυσικά στοιχεία απόκρισης στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Σημαντικό είναι ότι η ειδική προσθήκη σισπλατίνης στο DNA μειώνει τη συγγένεια δέσμευσης, της αλληλουχίας του DNA στην ενεργή μορφή άγριου τύπου ανθρώπινης πρωτεΐνης p53, ενώ η προσθήκη, της κλινικά μη αποτελεσματικής τρανσ-πλατίνης, δεν φέρει κάποια διαφορά (451). Ως εκ τούτου, υπάρχει ισχυρή πειραματική υποστήριξη για την άποψη ότι η σισπλατίνη μπορεί να αναστέλλει το μονοπάτι της p53 μέσω της δυνατότητας των DNA συμπλόκων να μειώσουν τη συγγένεια δέσμευσης της πρωτεΐνης p53 στην δικιά της αλληλουχία του DNA (451) .

Παρόλα αυτά, σημειώνεται ότι μπορεί να υπάρξει *in vivo* απόκριση στη σισπλατίνη, μέσω της εξαρτώμενης από p53 απόπτωση, ή ανεξάρτητα από την κατάσταση της p53 σε ξένα μοσχεύματα ανθρώπινων ωοθηκών (452), οπότε ο ρόλος της απόκρισης της p53 στην σισπλατίνη στα καρκινικά κύτταρα είναι ασαφής και εξαρτάται από το είδος του καρκίνου. Ο καρκίνος των όρχεων θεραπεύεται σε ένα εύρος του 80% με χημειοθεραπεία, που βασίζεται στη σισπλατίνη. Αυτή η απόκριση έχει συνδεθεί με γρήγορη *in vivo* και *in vitro* απόπτωση (453). Παρόλα αυτά, 10-20% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία και πεθαίνουν συχνά από προοδευτική ασθένεια (454). Διάφορες προσπάθειες έχουν γίνει για να κατανοηθεί η ευαισθησία αυτών των καρκίνων στη θεραπεία και όπως, επίσης, η αιτία της ανθεκτικότητας. Η απόκριση αυτή φαίνεται

να είναι ειδική για των καρκίνο των όρχεων και κυριαρχείται από τη p53 η οποία αξιολογήθηκε ως ένας σημαντικός στόχος της σισπλατίνης - που διαμεσολαβείτε από έκφραση γονιδίου και κυτταροτοξικότητα σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι σαράντα επτά γονίδια αυξορρυθμίζονται και πέντε γονίδια αναστέλλονται από την πλατίνη. Το 54% των γονιδίων που αυξορρυθμίζονται βρέθηκαν να σταθεροποιούνται ή να μειορρυθμίζονται από τη p53. Ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση της p53 έχει βρεθεί να συνδέεται με την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων των όρχεων στη χημειοθεραπεία και κάθε γονιδιακό προϊόν μπορεί να συμμετέχει στη μοναδική αντίδραση αυτής της ασθένειας.

1.11.4.1 Ενεργοποίηση της p53 και το μονοπάτι MAPK (mitogen- activated protein kinase)

Αν και, η διαμεσολάβηση της p53 στην τοξική δράση του κυττάρου, είναι μια άμεση συνέπεια της βλάβης του DNA, πρέπει πρώτα να λάβουν μέρος μια σειρά από γεγονότα, έτσι ώστε να επάγεται η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53. Ένα γνωστό γεγονός, είναι η ενεργοποίηση των κινασών, οι οποίες ρυθμίζουν την σταθερότητα και την μεταγραφική δραστηριότητα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Μεταξύ των δύο κινασών που συμπεριλαμβάνονται στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου, που ονομάζονται ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) και ATR (ATM-and Rad3-related protein), η σισπλατίνη, κατά προτίμηση, ενεργοποιεί την ATR κινάση (455, 456), η οποία φωσφορυλιώνει την p53 έτσι ώστε να αρχίζει η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 (457). Η ATR επίσης ενεργοποιεί και άλλους μεταγενέστερους στόχους, όπως είναι το ένα βήμα, ως προς την περαιτέρω τροποποίηση της p53, σε επιπρόσθετες θέσεις. Η σισπλατίνη, ενεργοποιεί επίσης και την CHK2 (Checkpoint kinase 2), η οποία είναι ένας καθοδικός στόχος της ATM, αλλά η δράση της σισπλατίνης στην CHK2 φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την ATM (455). Πιο πρόσφατα, η ATR έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση αλληλουχίας συγκεκριμένων μονοπατιών της MAPK (mitogen-activated protein kinase) (458, 459), το οποίο φωσφορυλιώνει την p53, σε διαφορετικές θέσεις (457, 460).

Η εμπλοκή του μονοπατιού της MAPK, στον τρόπο λειτουργίας της σισπλατίνης παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Τα κύρια μέλη της υποοικογένειας της MAPK περιλαμβάνουν, της εξωκυττάρια ERK (signal-regulated kinase), την JNKs (c-Jun N-terminal kinases) η οποία επίσης αναφέρεται και ως SAPK (stress-activated protein kinase), και η κινάση p38. Αυτά τα μέλη της MAPK συμμετέχουν στην ενσωμάτωση του εξωκυττάριου σήματος για να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την διαφοροποίηση τους, την επιβίωση των κυττάρων και την απόπτωση(461). Και τα τρία μέλη των κινασών, ενεργοποιούνται μετά από έκθεση των καρκινικών κυττάρων στην σισπλατίνη (462). Η ενεργοποίηση της ERK, είναι το πιο κρίσιμο σημείο για την επαγωγή της απόπτωσης από την σισπλατίνη, πράγμα το οποίο συνάδει με την ένδειξη ότι, η ενεργοποίηση της ERK από την σισπλατίνη συμβάλλει στην ρύθμιση της p53 μέσω της φωσφορυλίωσης της (460). Εξάλλου, αναστολή του μονοπατιού τις MEK-ERK οδηγεί σε ανθεκτικότητα στην σισπλατίνη (463). Άλλες μελέτες όπως, έρχονται σε πλήρη αντίθεση με τα παραπάνω, και προτείνουν ότι η ενεργοποίηση της ERK και της JNK της MAPK αλληλουχίας από την σισπλατίνη ανταγωνίζεται την απόπτωση (461). Είναι πιθανό, ότι και οι δύο επιδράσεις, που διαμεσολαβούνται μέσω MAPK να είναι σωστές, και η εμφανής διαφορά μπορεί απλώς να αντανακλά διαφορές σε γενικό πλαίσιο του κυττάρου ή στην έκταση της βλάβης του DNA. Έτσι, μπορεί να είναι πρόωρο στο στάδιο αυτό να συσχετίζεται οποιαδήποτε από τα μέλη της MAPK υποοικογένειας, από την κυτταροτοξική δράση της σισπλατίνης.

1.11.4.2 Επαγωγή της απόπτωσης

Έχει βρεθεί ότι η απόπτωση είναι συνέπεια της δράσης της σισπλατίνης και πολλών άλλων αντικαρκινικών φαρμάκων (464-466). Πολλοί συγγραφείς έχουν παρερμηνεύσει αυτά τα αποτελέσματα, όταν προτείνουν ότι η αναστολή της απόπτωσης είναι ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας. Είναι εμφανές ότι η απόπτωση ορίζεται καλύτερα ως ένας μηχανισμός δράσης της πλατίνης και μια αποτυχία του μηχανισμού ανθεκτικότητας. Η απόπτωση δεν αποτελεί εναλλακτική λύση για το σχηματισμό διασταυρούμενων συνδέσεων DNA (cross-links), ούτε για τη διαταραχή του κυτταρικού κύκλου όπως συμπεραίνεται. Αυτά είναι ακόμη ουσιώδη γεγονότα στην φάση εκκίνησης

της απόπτωσης. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην σισπλατίνη περιλαμβάνουν τη μειωμένη συσσώρευση του φαρμάκου και την αλλοιωμένη επιδιόρθωση του DNA. Παρόλα αυτά, η απόπτωση παρέχει ένα πλαίσιο για την κατανόηση ολόκληρου του μονοπατιού από την αρχική προσβολή ως το θάνατο του κυττάρου. Αυτό παρέχει την αντίληψη ότι υπάρχουν, επιπλέον, παράγοντες, που επηρεάζουν την επιβίωση και το θάνατο του κυττάρου. Η έκφραση μελών της οικογένειας Bcl-2 ή οι αλλαγές στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος έχουν αντίκτυπο στην απόκριση του κυττάρου στην πλατίνη.

Η φάση εκτέλεσης της απόπτωσης φαίνεται να είναι ένα σημείο, στο οποίο η κυτταροτοξικότητα της πλατίνης μπορεί να τροποποιηθεί. Οι μηχανισμοί εκτέλεσης της απόπτωσης είναι παρόντες σε όλα τα κύτταρα, οπότε στοχεύοντας αυτά τα στάδια, είναι απίθανο να παρέχουν κάποια εκλεκτική δράση κατά του όγκου. Σε αντίθεση, η τροποποίηση της φάσης εκτέλεσης της απόπτωσης αποτελεί ένα ενδιαφέρον θέμα μελέτης. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφοροποιήσει το μονοπάτι μεταγωγής σήματος με πολλούς τρόπους, κυρίως, μέσω ενεργοποίησης ενός υποδοχέα, όπως ο p185^{erbB2} (Her2/neu), ή ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως το Ras. Έχουν γίνει μερικές προσπάθειες παρεμβολής σε αυτά τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και έχει βρεθεί να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στη σισπλατίνη. Για παράδειγμα, τα αντισώματα για τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, (EGF), οδηγούν μόνο σε απραξία, αλλά ο συνδυασμός με σισπλατίνη προκαλεί σημαντικά συνεργικό θάνατο των κυττάρων (467). Έχει παρατηρηθεί το ίδιο, όταν τα αντισώματα, που ανταγωνίζονται τον p185^{erbB2} είχαν συνδυαστεί με σισπλατίνη(468).

Εν τέλει, συνεργασία έχει παρατηρηθεί από το συνδυασμό με τους αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης c και σισπλατίνης (469, 470).

Η σισπλατίνη έχει δείχτει να ενεργοποιεί την JNK (c-Jun N-terminal kinases) σε έναν αριθμό συστημάτων (471-473). Επιπλέον, η καταστολή της JNK σηματοδότησης, με μία κυρίαρχη αναστολή της SEK, καταστέλλει τη σισπλατίνης, που επάγει την απόπτωση (471). Στις μελέτες, που έχουν γίνει, η ενεργοποίηση της JNK έχει μετρηθεί μόνο έως και τρεις ώρες μετά την προσθήκη της σισπλατίνης. Η σημασία της ενεργοποίησης της JNK σε τόσο σύντομο χρόνο μετά τη θεραπεία, είναι δύσκολο να αιτιολογηθεί. Αυτή η ενεργοποίηση της JNK συμβαίνει πριν τα κύτταρα υποβληθούν στην αναστολή του

κυτταρικού κύκλου, και μερικές μέρες πριν τα κύτταρα περάσουν μια θανατηφόρα μίτωση και πεθάνουν. Οπότε, είναι πολύ νωρίς για να υπάρξει μια κατευθείαν δράση στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Έχει προταθεί ότι η JNK ρυθμίζει την επιδιόρθωση του DNA, ακολουθώντας την σισπλατίνη (474) και η ERK μπορεί να συμβάλει στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου (475). Ως εκ τούτου, μένει να διευκρινιστεί εάν η JNK έχει κάποιο ρόλο στην θανατηφόρα μίτωση και εάν η απόπτωση, που ακολουθεί, επάγεται από την σισπλατίνη. Επίσης, παραμένει να διευκρινιστεί, εάν η αναστολή του μονοπατιού της ERK, με αντισώματα, στον υποδοχέα EGF ή p185^{erbB2}, ακόμα, εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο και εάν το κύτταρο πεθαίνει γρήγορα χωρίς να εισέλθει σε μία θανατηφόρα μίτωση.

1.11.4.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Ο κύριος στόχος της χημειοθεραπείας είναι να οδηγήσει τα καρκινικά κύτταρα στην απόπτωση μετά από έκθεση σε ογκοκατασταλτικούς παράγοντες. Το ανόργανο φάρμακο σισπλατίνη είναι ένας δυνατός επαγωγέας της απόπτωσης(476, 477). Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται όταν τα καρκινικά κύτταρα αποτυγχάνουν να υποβληθούν στην απόπτωση, σε κλινικά σχετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Η ανθεκτικότητα αποκτάται μέσω της χρόνιας έκθεσης στο φάρμακο ή μπορεί να παρουσιάζεται ως ένα φυσικό φαινόμενο. Το ακριβές επίπεδο ανθεκτικότητας των ασθενών στην σισπλατίνη είναι δύσκολο να καθοριστεί. Από κλινικές μελέτες συνάγεται, ότι όταν η καθιερωμένη κλινική δόση της σισπλατίνης διπλασιάζεται, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα εντατικής θεραπείας με το φάρμακο, παρατηρήθηκε διπλή ανθεκτικότητα (478, 479). Γενικά, η ανθεκτικότητα στη σισπλατίνη μπορεί να είναι μεγαλύτερη, όπως συμπεραίνεται από μελέτες με καρκινικές κυτταρικές σειρές σε κλινικά ανθεκτικούς όγκους, οι οποίοι απαιτούν κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις 50-100 φορές περισσότερο από αυτές, που χρειάζονται στα ευαίσθητα καρκινικά κύτταρα(480-482). Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας της πλατίνης φαίνεται να είναι πιο σοβαρό από ό, τι έχει αναγνωριστεί στο παρελθόν. Με την κατανόηση ότι η κυτταροτοξική δράση της σισπλατίνης είναι μια περίπλοκη διαδικασία, που επεκτείνεται από την αρχική είσοδο του φαρμάκου μέσα στο κύτταρο, στα τελικά στάδια της απόπτωσης έπαιτε ότι ενδοκυτταρικά γεγονότα που

παρεμβαίνουν, σε κάθε στάδιο αυτής της διαδικασίας, θα αναστέλλουν την απόπτωση και θα οδηγούν σε ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Οπότε, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας, προκύπτουν ως συνέπεια ενδοκυτταρικών αλλαγών, που είτε αποτρέπουν τη σισπλατίνη να αλληλεπιδρά με το DNA, είτε παρεμβαίνει στα σήματα βλάβης του DNA ενεργοποιώντας την απόπτωση, ή και τα δύο παραπάνω. Υπάρχουν ουσιαστικές αποδείξεις για να δείξουν ότι το επίπεδο και η ανθεκτικότητα των συμπλόκων DNA, που επάγονται από τη σισπλατίνη συσχετίζονται κατευθείαν με την κυτταροτοξικότητα (483). Ελαττώνοντας την επέκταση της βλάβης του DNA, αυξάνεται η ανθεκτικότητα, και αυτό μπορεί να συμβεί μέσω αλλαγών στη συσσώρευση του φαρμάκου, το ενδοκυτταρικό επίπεδο θειολών, και/ή την επιδιόρθωση συμπλόκων DNA. Μείωση στα επίπεδα προϊόντων προσθήκης DNA (adduct) αποδίδεται, γενικά, σε βιοχημικές/μοριακές φαρμακολογικές μεταβολές, οι οποίες είναι δευτερεύουσες στις κύριες γενετικές αλλαγές. Από τη άλλη μεριά, η παρέμβαση κατά την εκκίνηση ή μεταγωγή βλαβερών σημάτων, για να ανασταλεί η ενεργοποίηση της απόπτωσης, οφείλονται σε αλλαγές στα μοριακά βιολογικά/γενετικά επίπεδα. Επίσης, ένας μοναδικός μηχανισμός ανθεκτικότητας σισπλατίνης είναι δυνατός (481), πρακτικά όμως είναι πολύ σπάνιο. Γενικά, η ανθεκτικότητα είναι πολυλειτουργική ενώ διάφοροι μηχανισμοί συναντώνται ταυτόχρονα μέσα στο ίδιο καρκινικό κύτταρο (466, 484, 485). Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας είναι ένα καθαρό αποτέλεσμα διάφορων μηχανισμών (486), πράγμα το οποίο προσθέτει δυσκολία, στην προσπάθεια να παρακαμφθεί η αντίσταση στην σισπλατίνη ως θεραπευτική στρατηγική.

1.11.5 Δράση αντιοξειδωτικών ουσιών κατά της τοξικότητας τις σισπλατίνης

Η θεραπεία κακοήθων νοσημάτων από το συνδυασμό ενός φυτοχημικού και ενός αντικαρκινικού φαρμάκου μπορεί να είναι μια ρεαλιστική και ελπιδοφόρα επιλογή. Έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες ότι τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά μπορεί να «αποτοξινώνουν» από τις ενεργές μορφές οξυγόνου και μπορεί να επαυξάνουν την αντικαρκινική δράση της χημειοθεραπείας, καθώς και να ελαττώνουν κάποιες από τις παρενέργειες (487). Κάποιες παρενέργειες, όπως η αλωπεκίαση και η μυελοκαταστολή, δεν εμποδίζονται από τα αντιοξειδωτικά, και ουσίες, που μειώνουν ή εμποδίζουν αυτές

τις παρενέργειες, μπορεί να παρεμβαίνουν στην αντικαρκινική αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας (487).

Πολλοί ασθενείς έχουν συμβουλευθεί να μην χρησιμοποιούν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής και άλλα θρεπτικά συστατικά, ενώ υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, επειδή υπάρχει μια εσφαλμένη εξήγηση αλλά που φαίνεται λογική, ότι τα αντιοξειδωτικά παρεμβαίνουν στην ακτινοβολία και σε μερικές χημειοθεραπείες, διότι αυτές οι ουσίες της χημειοθεραπείας σκοτώνουν μέσω της παραγωγής ελεύθερων ριζών, οι οποίες εξουδετερώνονται από τα αντιοξειδωτικά. Άλλη μια λανθασμένη ιδέα είναι ότι το φολικό οξύ επεμβαίνει στην μεθοτρεξάτη (488-491). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά δεν παρεμβαίνουν στην χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία. Επιπλέον, δεν είναι το φολικό οξύ, που παρεμβαίνει στη δράση της μεθοτρεξάτης, αλλά μάλλον το φολινικό οξύ, το οποίο δεν είναι ούτε βιταμίνη ούτε και αντιοξειδωτικό (492-494). Σε μια μελέτη 40 ατόμων, στο στάδιο IIIB ή IV με καρκίνο στον πνεύμονα, τα άτομα αυτά υποβλήθηκαν σε θεραπεία σισπλατίνης, βινδεσίνης, 5-φθοριοουρακίλης, β-ιντερφερόνης και βιταμίνης A (2 φορές την ημέρα). Η βιταμίνη A μείωσε τις παρενέργειες και αύξησε την επιβίωση, συγκριτικά με προηγούμενες ομάδες ελέγχου (495). Σε μια τυχαία μελέτη 100 ασθενών, που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση και με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, αυτά υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία. Στους ασθενείς δόθηκαν καθημερινά δόσεις βιταμίνης A. Η βιταμίνη A αύξησε το ποσοστό πλήρους απόκρισης, την διάρκεια της, και την προβλεπόμενη επιβίωση (496).

Σε μια τυχαία μελέτη 20 ασθενών, με προχωρημένο πλακώδες καρκίνωμα του στόματος, στους ασθενείς έγινε ακτινοθεραπεία. Την εβδομάδα πριν και μετά την ακτινοθεραπεία και, επίσης, την τρίτη και την έκτη εβδομάδα της ακτινοθεραπείας, στους ασθενείς δόθηκαν και ενέσεις χημειοθεραπείας. Οι ασθενείς έλαβαν, επίσης, με τυχαίο τρόπο συμπλήρωμα β-καροτένιου (250 mg τις ημέρες 1-21 και 75 mg μετά). Οι ασθενής, που έλαβαν βήτα-καροτένιο, είχαν λιγότερες σοβαρές οξείες αντιδράσεις του βλεννογόνου(497).

Μελέτες έχουν δείξει την προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών στην καταστροφή του DNA, που επάγεται από διάφορους παράγοντες του περιβάλλοντος, ιονίζουσα ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικές ουσίες (498-500). Έχει μελετηθεί η δράση της βιταμίνης C στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα σισπλατίνη, η οποία επάγει την

κυτταροτοξικότητα και την οξειδωτική καταστροφή του DNA σε ποντίκια. Παρατηρήθηκε ότι μετά από ενδοπεριτονιακή χορήγηση σισπλατίνης σε τρεις ομάδες ζώων (ομάδα 1: χορηγήθηκε 0.5mL νερό+ 2.0 mL σισπλατίνη, ομάδα 2: χορηγήθηκε 50 mg/kg⁻¹ βιταμίνης C + 2.0 mL σισπλατίνη, ομάδα 3: χορηγήθηκε 100 mg/kg⁻¹ βιταμίνης C+ 2.0 mL σισπλατίνη), τα ζώα της ομάδας με τη μεγαλύτερη δόση βιταμίνης C, έχασαν λιγότερο βάρος από τα υπόλοιπα ζώα (501). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε μια πιθανή προστατευτική δράση της βιταμίνης C, που σχετίζεται με τις παρενέργειες του παράγοντα κατά του όγκου. Σχετικά με την απέκκριση κρεατινίνης, παρατηρήθηκε μια μείωση στα επίπεδα κρεατινίνης ουροποιητικού στην ομάδα, που χορηγήθηκε μόνο σισπλατίνη, και παρατηρήθηκε αύξηση κρεατινίνης στις ομάδες 2 και 3, γεγονός που υποδηλώνει μια ελάττωση της τοξικής δράσης και των δυο δόσεων βιταμίνης C. Όπως αποδεικνύεται, η τοξικότητα από σισπλατίνη επάγει την αύξηση στην κρεατινίνη του πλάσματος και μειώνει τα επίπεδα κρεατινίνης του ουροποιητικού (502). Ένας σημαντικός παράγοντας στα παραπάνω αποτελέσματα είναι η διαφορά στο χρόνο μεταξύ της θεραπείας με βιταμίνη C και της επαγωγής του οξειδωτικού στρες. Στην παρούσα μελέτη, η σισπλατίνη χορηγείται μια ώρα μετά την βιταμίνη C, και αυτό το χρονικό διάστημα μπορεί να μην είναι αρκετό για να απορροφηθεί η προστατευτική δράση του αντιοξειδωτικού. Στα ζώα, με αγωγή με βιταμίνη C, 24 ώρες πριν την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, παρουσίασαν αναστολή της κυτταροτοξικότητας και μεταλλαξιγόνας δράσης, που συνδέονται με το στρες. Η χορήγηση της βιταμίνης C στα ζώα, 12 ώρες πριν την χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα σισπλατίνη, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της τοξικής δράσης, που προκαλείται από αυτήν (503).

Η κύρια αρνητική επίπτωση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, σισπλατίνη, είναι η τοξική δράση στο νεφρικό σύστημα. Αναφέρεται ότι, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E αποτρέπουν αυτή τη νεφροτοξικότητα σε πολύ μεγάλες δόσεις (1.0g/kg μάζας σώματος) (503). Η χορήγηση από του στόματος του μονογλυκοσιδίου ασκορβικού οξέος (AsAG) και του μονογλυκοσιδίου α-τοκοφερόλης (TMG) σε μη τοξικές ποσότητες, αποτρέπουν την νεφροτοξικότητα, που επάγεται από τη σισπλατίνη. Τα νεφρικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δράση των SOD, CAT και GPx, μειώνονται σημαντικά στις ομάδες, που γίνεται θεραπεία με σισπλατίνη συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Θεραπεία με AsAG και TMG (500mg/kg βάρος σώματος), μαζί με σισπλατίνη, μπορεί να

αποτρέψει σημαντικά τη μείωση νεφρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η θεραπεία με AsAG και TMG αποτρέπει την υπεροξείδωση λιπιδίων, ενισχύοντας τη δράση των SOD, CAT και GPx. Επιπλέον, η θεραπεία με AsAG και TMG προσδίδει προστασία, εξαιτίας της αύξησης της συγκέντρωσης της GSH, που μπορεί να προστατέψει τα νεφρικά κύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή (504).

Κατά την άποψη κλινικών εφαρμογών, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, το φλαβονοειδές σιλυβίνη, είναι συνεργιστικό με τα δύο πιο κοινά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του γυναικολογικού καρκίνου, τη σισπλατίνη και τη δοξορουβικίνη. Η συνεργιστική αντι-πολλαπλασιαστική δράση της σιλυβίνης και της σισπλατίνης, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η σιλυβίνη σταματά τα κύτταρα στη G0-G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όταν τα κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα στη δράση της πλατίνης (505). Ενώ η συνεργιστική δράση της σιλυβίνης και της δοξορουβικίνης μπορεί να εξηγηθεί από την πιθανότητα ότι, όπως και με άλλα φλαβονοειδή (506), η σιλυβίνη αναστέλλει την έκφραση και τη λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης p170.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί η αντικαρκινογόνος δράση επιλεγμένων φυτοχημικών ουσιών μόνων τους αλλά και σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη. Επιλέχθηκαν κάποια φλαβονοειδή φυτοχημικά και συγκεκριμένα η κουερσετίνη, η επιγαλοκατεχίνη η ναρινγίνη και η ρουτίνη οπώς και κάποια μη φλαβονοειδή φυτοχημικά και συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη, το γαλλικό οξύ, και η κουρκουμίνη. Η δράση των ουσιών αυτών μελετήθηκε, *in vitro* σε κυτταρικά μοντέλα, αλλά και σε *in vivo* μοντέλα τοξικότητας πειραματοζώων επίμυων Wistar, λόγω του ότι η δράση τους είναι αμφιλεγόμενη.

In vitro

Σκοπός της *in vitro* μελέτης ήταν να ερευνηθεί η δράση των προαναφερθέντων φυτοχημικών στην ανάπτυξη και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά LMS (leiomyosarcomatic cell line- λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar), στην ανθεκτική σειρά στην σισπλατίνη H1299 (human non-small cell lung carcinoma cells-κυτταρική σειρά από καρκίνο του πνεύμονα) και MRC-5 (Normal Human Fetal Lung Fibroblast-Φυσιολογικοί ινοβλάστες από πνεύμονα εμβρύου). Έμφαση δόθηκε στον συνδυασμό φυτοχημικών και σισπλατίνης, και στην δράση που έχουν τα φυτοχημικά αυτά στην τοξικότητα της σισπλατίνης. Η θεραπεία κακοήθων νοσημάτων από το συνδυασμό ενός φυτοχημικού και ενός αντικαρκινικού φαρμάκου μπορεί να είναι μια ρεαλιστική και ελπιδοφόρα επιλογή.

In vivo

Σκοπός ήταν να μελετηθεί η τοξικότητα της χορήγησης της σισπλατίνης σε επίμυες Wistar, όπως και το φυτοχημικό κουρκουμίνη .

Χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις κουρκουμίνης σε διαφορετικά σχήματα χορήγησης

1. Πριν την δόση της σισπλατίνης
2. Μετά την δόση της σισπλατίνης
3. Πριν και μετά την δόση της σισπλατίνης

Σκοπός ήταν να μελετηθεί εάν η κουρκουμίνη κατά την χημειοθεραπεία επηρεάζει τους αιματολογικούς δείκτες, εάν επηρεάζει τα προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα στον ορό των πειραματοζώων

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 In vitro ΜΕΛΕΤΗ

2.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια στην *In vitro* μελέτη

- Τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 100 mm, πολυτρυβλία 6, 24 θέσεων & 96 θέσεων
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) – Low glucose (1g/L) with L-glutamine,
της εταιρείας PAA
- FBS (Fetal bovine serum), της εταιρείας BIOCHROM AG
- Penicillin/streptomycin, της εταιρείας PAA
- L-Glutamine, 200 mM (100x), της εταιρείας PAA
- PBS (Phosphate Buffered Saline), της εταιρείας Sigma-Aldrich
- DMSO (Dimethylsulfoxid Methyl Sulfoxide), της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Trypsin- EDTA, της εταιρείας PAA
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Methanol, της εταιρείας Fluka
- Acetic Acid, της εταιρείας Fluka
- Πλάκες Neubauer
- Πιπέτες Pauster
- Ορολογικές πιπέτες (5,10,25 ml)
- Πιπέτες Gillson (2-20, 10-200, 100- 1000 μl)
- Πολυπιπέτα
- Falcon (15 και 50 ml)
- Giemsa Stain Modified Solution και NaCl, της εταιρείας Riedel-de Haen
- Annexin V-FITV, της εταιρείας BD Pharmingen TM
- Propidium Iodide solution, P4864, της εταιρείας Sigma
- Oligomycin, της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Mitochondrial Viability Stain, της εταιρείας abcam, ab129
- Flow Cytometer (Partec ML, Partec GmbH, Germany)

2.1.2. Φυτοχημικές ουσίες και χημειοθεραπευτικά

- (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), ≥80% from green tea, E4268, Sigma
- Gallic Acid, 97.5-102.5% (titration), G7384, Sigma
- Rutin hydrate, ≥94%, R5143, Sigma
- Quercetin dihydrate, ≥98%, Q0125, Sigma
- Resveratrol, ≥98%, R5010, Sigma
- Naringin, ≥90% from citrus fruit, N1376, Sigma
- Curcumin, ≥65% from curcuma longa, C1386, Sigma
- cis-Diammineplatinum(II) dichloride (cisplatin), P4394, Sigma

2.1.3. Κυτταρικές σειρές

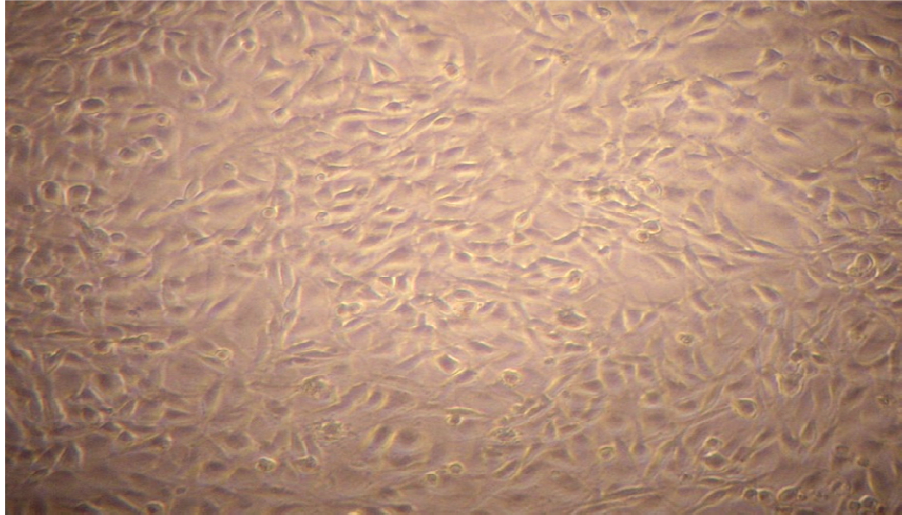
Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξής: λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS), ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα (H1299), και φυσιολογικοί ινοβλάστες (MRC-5).

2.1.3.1. Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (LMS)

Το λειομυοσάρκωμα είναι ένας σπάνιος όγκος του μαλακού ιστού συνήθως προερχόμενος από τα τοιχώματα των φλεβών ή από μυϊκά κύτταρα. Το δερματικό και υποδερματικό λειομυοσάρκωμα παρατηρείται σε ανθρώπους 40 έως 70 ετών και δεν εξαρτάται από το φύλο. Το βαθύτερο λειομυοσάρκωμα βρίσκεται στο οπισθοπεριτοναϊκό χώρο ή στους βαθύτερους μαλακούς ιστούς των άκρων.

Ιστολογικά, ο όγκος έχει ευρέως διασκορπισμένα αξονικά κύτταρα και κολλαγόνο στις δέσμες. Τα αξονικά κύτταρα είναι μεγάλα, με επιμήκεις πυρήνες και άφθονα ηωσινοφιλικά κυτοπλάσματα. Το κολλαγόνο είναι παρόν σε διάφορες συγκεντρώσεις και οι δικτυωτές ίνες του προεξέχουν γύρω από μεμονωμένα κύτταρα ή από ομάδες κυττάρων. Η χημειοθεραπεία σπάνια βοηθά στη θεραπεία του λειομυοσαρκώματος. Η

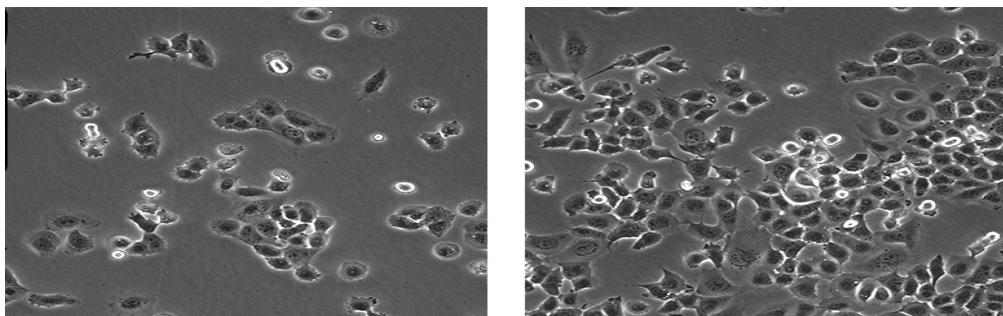
χειρουργική αφαίρεση του όγκου ενδείκνυται συχνά. Η θεραπεία του λειμυοσαρκώματος περιλαμβάνει την χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία και χειρουργική επέμβαση (507).



Εικόνα 15. Φωτογραφία λειομυοσαρκωματικών κυττάρων από μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης

2.1.3.2 Καρκινική κυτταρική σειρά του πνεύμονα (H1299)

Η κυτταρική σειρά H1299 γνωστή και ως NCI-H1299 δημιουργήθηκε αρχικά από κύτταρα του πνεύμονα ενός καυκασιανού 43-χρονου άνδρα ασθενή που υπέφερε από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Αυτά τα κύτταρα προέρχονται από θέση μεταστατικού λεμφαδένα, και εμφανίζουν μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων. Στερούνται έκφραση της πρωτεΐνης p53. Η κυτταρική σειρά NCI-H1299 είναι χρήσιμη για τη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα στους ανθρώπους.

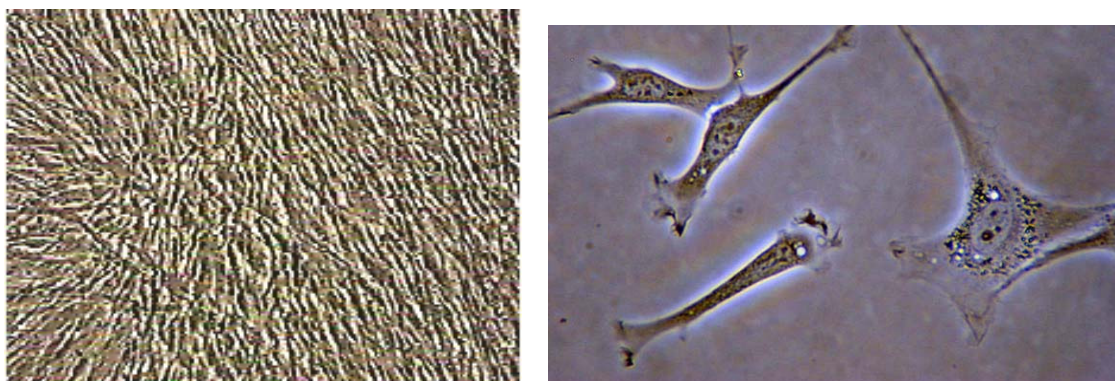


Εικόνα 16. Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων H1299

2.1.3.3. Φυσιολογική σειρά ινοβλαστών (MRC-5)

Η ινοβλάστη αποτελεί τον μόνο κυτταρικό τύπο που απαντάται, σε όλα τα είδη συνδετικού ιστού. Έχει σχήμα ατρακτοειδές ή αστεροειδές και από το κυτταρικό σώμα προεκβάλλουν κοντές, διακλαδιζόμενες αποφυάδες. Στο ενήλικο άτομο οι ινοβλάστες εκκρίνουν ενεργά κολλαγόνο. Περιέχουν μεγάλο ωοειδή πυρήνα, του οποίου η χρωματίνη συγκεντρώνεται σε περιφερικά αθροίσματα κάτω από την πυρηνική μεμβράνη. Σε κεντρικότερη θέση του πυρήνα διακρίνεται ένα ευμέγεθες πυρήνιο.

Το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο και περιέχει τα οργανίδια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Οι ινοβλάστες συνθέτουν τις πρωτεΐνες των ινών του συνδετικού ιστού (κολλαγόνων δικτυωτών, ελαστικών), τις δομικές γλυκοπρωτεΐνες και τις πρωτεογλυκάνες της θεμέλιας ουσίας. Έτσι, ελέγχουν τη σύσταση αλλά και τη διατήρηση της ακεραιότητας αυτής(508).



Εικόνα 17. Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων MRC-5.

2.1.4 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια των διαφόρων κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room), ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι σχετικοί χειρισμοί των κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH

στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Οι LMS και H1299 κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/l), εμπλουτισμένο με 10% ορού εμβρύων βοοειδών (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και 0.5% L-γλουταμίνης, ενώ για τους φυσιολογικούς ινοβλάστες προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη.

Για την ανάπτυξη οποιαδήποτε κυτταρικής σειράς συνήθως απαιτείται προσθήκη ορού στο καλλιεργητικό μέσο. Αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί όλα τα συστατικά που περιέχει ο ορός, κυρίως αναπτυξιακή παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο βοοειδούς.

Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, ενώ η μακρόχρονη συντήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192 °C).

2.1.4.1. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα αφήνονται να δημιουργήσουν πλήρεις καλλιέργειες πριν από κάθε ανακαλλιέργεια. Για την ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού (DMEM), πλύση με 10 ml PBS και ακολούθως γίνεται προσθήκη 1ml θρυψίνης. Στη συνέχεια τα τρυβλία αφήνονται για 3 λεπτά εντός του επωαστικού θαλάμου, ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη. Μετά την πάροδο των 3 λεπτών, τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο και από τα τοιχώματα του τρυβλίου με μηχανική βοήθεια πιπέτας και προστίθενται 10ml DMEM. Ακολούθως πραγματοποιείται καλή ανάδευση και τοποθετείται ο επιθυμητός όγκος του εναιωρήματος κυττάρων στα τρυβλία των 90mm. Τέλος, σε κάθε τρυβλίο προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα DMEM, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι πάντα 10ml.

2.1.4.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

Η κατάψυξη των κυττάρων σε υγρό άζωτο (-196°C) αποτελεί τον καλύτερο τρόπο διατήρησης αυτών για χρονικό διάστημα 6-12 μηνών το λιγότερο. Εν γένει, κατά τη

διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού, πλύση με 10 ml PBS και προσθήκη 1 ml θρυψίνης. Αφού παρθεί το εναιώρημα των κυττάρων, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (3000 rpm για 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν απόχυσης του υπερκειμένου, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα 90% εμβρυϊκού μόσχου (FBS, fetal bovine serum) και 10% διμεσουλφοξείδιο (DMSO, dimethyl sulfoxide). Το DMSO περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη και τη σταθεροποιεί έναντι της θραύσης αυτής από τη χαμηλή θερμοκρασία. Ακολούθως, το κυτταρικό εναιώρημα διαμοιράζεται σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης, όπου και καταψύχεται σταδιακά (πτώση 1°C) μεταβαίνοντας από τους -20°C, στους -80°C και τέλος στους -196°C.

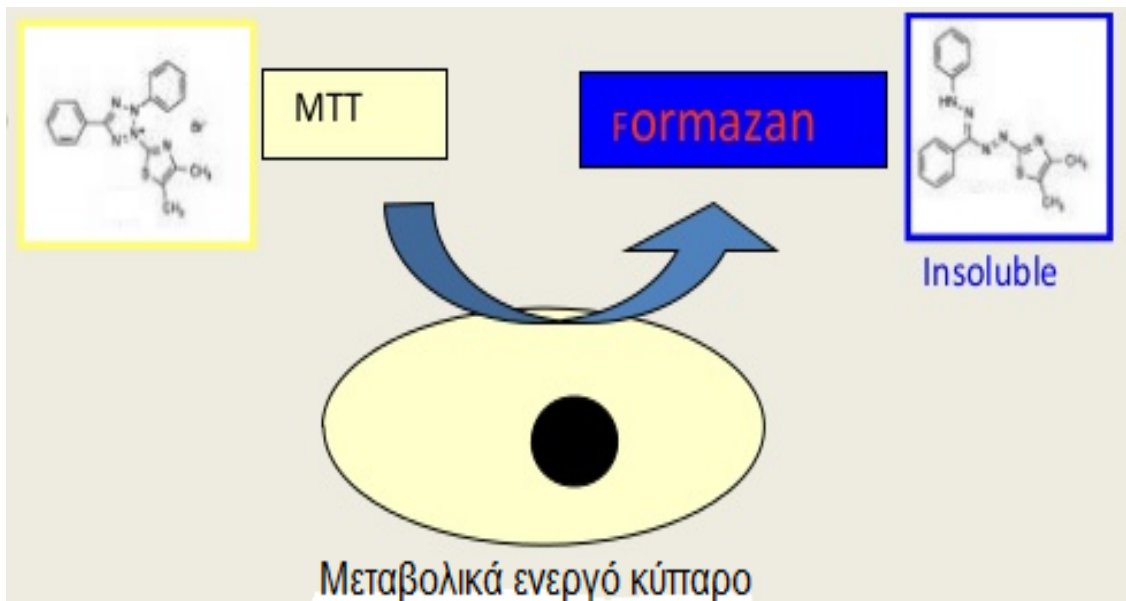
Η απόψυξη των κυττάρων έλαβε χώρα με ταχεία μεταφορά των φιαλιδίων κατάψυξης σε υδατόλουτρο των 37°C. Εκεί τα φιαλίδια διατηρήθηκαν μέχρι αποψύξεως, με ήπια ανακίνηση. Το εναιώρημα των κυττάρων υπέστη αραίωση σε 50 ml εξισορροπημένου αλατούχου διαλύματος (hank's balanced salt solution, HBSS) και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm, 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, όντας έτοιμο προς περαιτέρω καλλιέργεια.

2.1.5 Έλεγχος της βιωσιμότητας κυττάρων με την μέθοδο του MTT (MTT assay)

Από ένα αρχικό τρυβλίο στο οποίο διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθενται 10 ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, αναρροφάται το PBS και γίνεται προσθήκη 1 ml θρυψίνης για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση το τρυβλίο τοποθετείται για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή (37°C). Για τον τερματισμό της αντίδρασης με την θρυψίνη προστίθενται 10 ml DMEM, γίνεται ανάδευση με την πιπέτα και τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon. Τοποθετούνται 11 μl κυτταρικού εναιωρήματος σε πλάκα Newbauer και γίνεται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων καθώς και η ποσότητα που απαιτείται για την προσθήκη του επιθυμητού αριθμού κυττάρων (5000 κύτταρα για τις κυτταρικές σειρές των LMS, και H1299, και 7000 κύτταρα για την κυτταρική σειρά MRC-5) σε κάθε

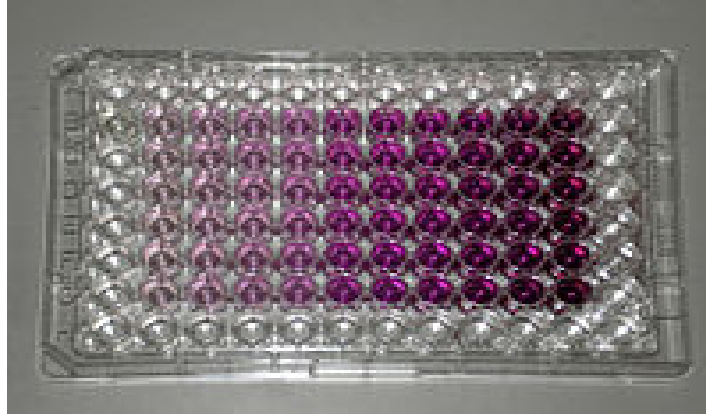
φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου πρέπει να είναι 100 μl και συμπληρώνεται με DMEM. Η συνολική ποσότητα κυττάρων και DMEM που απαιτούνται, τοποθετούνται μαζί και γίνεται σπορά 100 μl σε κάθε φρεάτιο με χρήση πολυπιπέτας. Μετά την σπορά των κυττάρων το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 24 ώρες. Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται και η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων φυτοχημικών ουσιών, και συγκεκριμένα της επιγαλοκατεχίνης, της κουερσετίνης, της ρουτίνης της ναρινγίνης, της ρεσβερατρόλης, της ρουτίνης, του γαλλικού οξέως, και της κουρκουμίνης. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα προεπωάζονται με τις φυτοχημικές ουσίες η προσθήκη φυτοχημικού γίνεται την στιγμή που γίνεται και η σπορά. Έπειτα το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 24 ώρες. Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη σισπλατίνης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος MTT περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη DMSO (dimethylsulphoxide) και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm.



Εικόνα 18. Η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Μετά από 48 ώρες από την προσθήκη επιθυμητών ουσιών σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου τοποθετούνται 50 μl MTT και τα πολυτρυβλία παραμένουν για 3 ώρες στον επωαστή. Μετά την πάροδο των 3 ωρών αναρροφάται το υπερκείμενο προσεκτικά, γίνεται προσθήκη 200 μl DMSO σε κάθε φρεάτιο, καλή ανάδευση και ακολουθεί μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA μήκος κύματος 540 – 570 nm και φίλτρο αναφοράς 690nm). Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.



Εικόνα 19. Κύτταρα σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων μετά από 3 ώρες επώαση με το MTT

2.1.6 Προσδιορισμός μηχανισμού πρόκλησης κυτταρικού θανάτου (Απόπτωση-Νέκρωση)

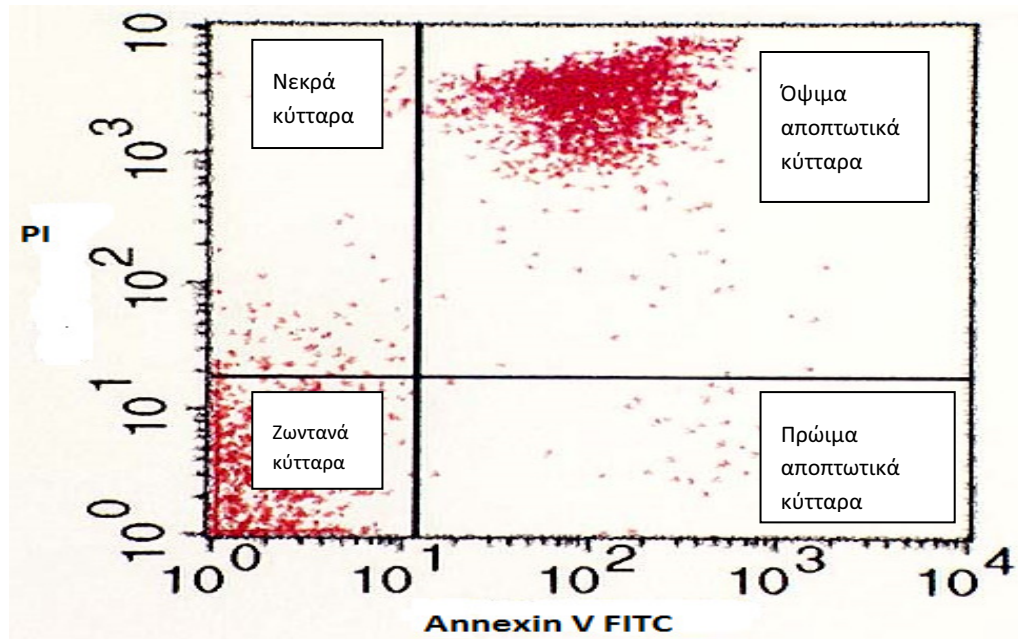
Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση παραμέτρων φθορισμού μονήρων κυττάρων που βρίσκονται σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Η κυτταρομετρία ροής αναφέρεται και ως φθορισμοενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (Fluorescence Activated Cell Scanning- FACS), εξαιτίας του γεγονότος ότι χρησιμοποιείται ο φθορισμός για την ανάλυση των κυττάρων. Για την μέτρηση των κυτταρικών εναιωρημάτων απαιτείται η υδροδυναμική εστίαση σε μια κεντρική ροή και εισαγωγή των κυττάρων ένα-ένα σε μια κυψελίδα ροής και από μια πηγή προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ανάλυση των δειγμάτων αξιοποιεί τη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία, οι οποίες μετρώνται από ειδικούς ανιχνευτές.

Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα ή περισσότερα laser, είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, η οποία μετράται από το κυτταρόμετρο ροής ως εκπομπή φθορισμού (Fluorescence Emission). Ταυτόχρονα, όμως, καθώς προσπίπτει στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Η σκέδαση εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα στο κυτταρόμετρο ροής να διαχωρίζει τον πληθυσμό ενός δείγματος σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), η οποία μετράται σε μικρή γωνία $1-19^\circ$ και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων και την πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC), που μετράται στις 90° και

καθορίζει την κοκκίωση των κυττάρων. Η ταυτόχρονη ανάλυση της πρόσθιας και πλευρικής σκέδασης σε ένα ιστογράμμα δύο διαστάσεων επιτρέπει τον διαχωρισμό του πληθυσμού από ένα ετερογενές μείγμα ή από θραύσματα νεκρών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η απομόνωση ηλεκτρονικά του κυτταρικού πληθυσμού που μας ενδιαφέρει με την εφαρμογή μιας περίφραξης (gate) γύρω από αυτόν. Η ανάλυση των υπολοίπων παραμέτρων μπορεί να γίνει με ιστογράμματα έντασης φθορισμού.

2.1.7 Χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και αννεξίνη (Annexin)

Για τον προσδιορισμό των αρχικών σταδίων της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται η μέθοδος με Αννεξίνη V. Οι αννεξίνες αποτελούν μια οικογένεια ασβέστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών που προσδένονται σε φωσφατιδυλοσερίνες, οι οποίες στα υγιή κύτταρα εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά την έναρξη της απόπτωσης χάνεται η ασυμμετρία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και οι φωσφατιδυλοσερίνες μετατοπίζονται στην εξωκυτταρική πλευρά της, όπου ανιχνεύονται από τη σημασμένη με FITC Αννεξίνη. Τα τελευταία στάδια της απόπτωσης χαρακτηρίζονται από τον κατακερματισμό του DNA και την διαπερατότητα των μεμβρανών. Σε αυτά τα στάδια το ιωδιούχο προπίδιο (PI) εισέρχεται στο κύτταρο και προσδένεται στο DNA. Στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, όμως, τα κύτταρα αποκλείουν την είσοδο σε χρωστικές, όπως είναι το ιωδιούχο προπίδιο. Τα ζωντανά κύτταρα είναι αρνητικά στην Annexin V-FITC και στο PI. Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι θετικά στην Annexin V-FITC και αρνητικά στο PI. Τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι θετικά στην Annexin V-FITC, αλλά και στο PI, στο οποίο είναι θετικά και τα νεκρά κύτταρα.



Εικόνα 20. Προσδιορισμός αποπτωτικών κυττάρων, νεκρωτικών κυττάρων καθώς και των ζωντανών με την Annexin, PI, με κυτταρομετρία ροής.

Πραγματοποιείται σπορά 60.000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ενός πολυτρυβλίου 6x. Τα τρυβλία επώάζονται στους 37 °C. Την στιγμή που γίνεται η σπορά των κυττάρων γίνεται και η προσθήκη της φυτοχημικής ουσίας για επώαση. Μετά την πάροδο 24 ωρών, πραγματοποιείται προσθήκη της σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί επώαση για άλλες 48 ώρες και ξεκινά η διαδικασία προετοιμασίας για την κυτταρομετρία.

Το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από το κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου σε αντίστοιχα falcon τον 15ml. Πραγματοποιείται πλύση με 1 ml PBS, το οποίο συλλέγεται και αυτό στα falcon. Προστίθενται 0,3 ml Trypsin και τα πολυτρυβλία επώάζονται στους 37°C για περίπου 5 λεπτά, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Προστίθεται 1 ml θρεπτικό υλικό, ακολουθεί καλή ανάδευση και συλλέγονται συνολικά τα 1,3 ml στα αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιείται μέτρηση σε πλάκα Newbauer για να υπολογιστεί ο ακριβής αριθμός του κυτταρικού πληθυσμού. Τα falcon φυγοκεντρούνται στις 2500 rpm για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται στην κατάλληλη ποσότητα Calcium Buffer 1x και μια ποσότητα 100 μl από κάθε δείγμα, που περιέχουν 100.000 κύτταρα, μεταφέρονται σε αντίστοιχα erpendorfs.

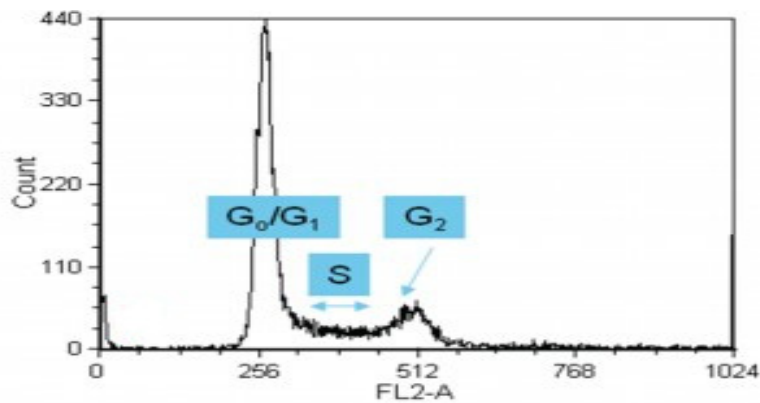
Σε κάθε erpendorf προστίθενται 5 μl Annexin και 4 μl Propidium Iodide. Όλα τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών προστίθεται επιπλέον 1 ml Calcium Buffer 1x. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο, καθότι η Annexin είναι φωτοευαίσθητη. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται στο κυτταρόμετρο ροής (CyFlow ML, Partec, Munster, Germany), όπου και πραγματοποιείται ανάλυση και προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

2.1.8. Ανάλυση Κυτταρικού κύκλου (Cell cycle)

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα περίπλοκο σύστημα σημείων ελέγχου (cell cycle checkpoints), ώστε να εξασφαλίζουν τη σωστή πορεία του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα σημεία ελέγχου «επιβλέπουν» την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ύστερα από έκθεση σε περιβαλλοντικά στρες ή ύστερα από τυχαίες διαταραχές, όπως πιθανές βλάβες στο DNA ή λάθη κατά την αντιγραφή του. Ο όρος “σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου” (“cell cycle checkpoint”) αναφέρεται στους μηχανισμούς με τους οποίους τα κύτταρα ενεργά σταματούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ώστε να έχουν χρόνο μέχρι να διορθωθούν τυχόν βλάβες που έχουν υποστεί ή αλλιώς να οδηγηθούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, στα σημεία ελέγχου πιστοποιείται η ομαλή διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και παρεμποδίζεται η μετάβαση στην επόμενη φάση του κύκλου, εάν δεν έχουν ολοκληρωθεί με επιτυχία όλα τα προηγούμενα στάδια. Αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία του ηλίου, η υπέρυθη ακτινοβολία, καθώς και διάφορες μεταλλαξιγόνες χημικές ουσίες προκαλούν βλάβες στο DNA, οι οποίες πρέπει να επιδιορθωθούν γιατί σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία καρκίνου. Ωστόσο, η πρόκληση βλάβης στο DNA χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου, καθώς αρκετές αντικαρκινικές θεραπείες (ακτινοθεραπεία και αρκετά χημειοθεραπευτικά

φάρμακα) στοχεύουν το DNA. Παρόλα αυτά, αρκετές από τις παρενέργειες της αντικαρκινικής θεραπείας οφείλονται σε βλάβες του DNA.

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε σπορά 60.000 LMS κυττάρων σε πολυτρυβλία 6 φρεατίων. Την στιγμή που πραγματοποιήθηκε η σπορά έγινε και η προσθήκη φυτοχημικών ουσιών στις τιμές επώασης. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και μετά από αυτό το χρονικό διάστημα προστέθηκε η σισπλατίνη στην συγκέντρωση του IC50. Μετά από 48 ώρες επώασης αναρροφήθηκε το υπερκείμενο και έγινε πλύση με 3ml PBS το οποίο και αυτό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 37°C έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστέθηκαν επιπλέον 3ml PBS και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με την χρήση πιπέτας. Αφού αποκολλήθηκαν πλήρως τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε falcon και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και στις 3.500 rpm και απορρίφτηκε το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 50 ng/ml ιωδιούχο προπίδιο, όπως περιγράφεται (509). Η κατανομή κυτταρικού κύκλου αναλύθηκε σε BD κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur και τα δεδομένα που ελήφθησαν αναλύθηκαν με λογισμικό CellQuest V.3.1



Εικόνα 21. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως απεικονίζονται από κυτταρόμετρο ροής.

2.1.9 Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς (Colony efficiency)

Στόχος είναι να μελετηθεί η ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν μεγάλες, αυτοσυντηρούμενες αποικίες στις διάφορες συγκεντρώσεις των φυτοχημικών και της σισπλατίνης, σε σύγκριση με την ικανότητα αυτή των κύτταρων στα οποία δεν έχει προστεθεί καμία ουσία (control).

Από ένα αρχικό τρυβλίο που διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 10 ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το PBS και προστίθεται 1 ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση τοποθετείται το τρυβλίο για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή. Προστίθενται 10 ml DMEM, τα κύτταρα αναδεύονται καλά και συλλέγονται σε falcon. Λαμβάνονται 11 μl και τοποθετούνται σε πλάκα NeuBauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων, καθώς και της ποσότητας που απαιτείται για την σπορά 20000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ενός πολυτρυβλίου 24 φρεατίων. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό στο 1 ml. Σε αυτή τη φάση γίνεται και προσθήκη των φυτοχημικών για επώαση. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη της σισπλατίνης. Από ένα αρχικό διάλυμα υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση συμπλόκου σε τελικό όγκο 1 ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 48 ώρες.

Μετά την πάροδο του επιθυμητού χρονικού διαστήματος πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο και μεταφορά 5000 κυττάρων στα αντίστοιχα τρυβλία των 6 φρεατίων με την προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για χρονικό διάστημα περίπου 7 ημερών με καθημερινή οπτική παρακολούθηση ενώ πραγματοποιείται και μια αλλαγή θρεπτικού υλικού την 3-4 ημέρα. Μετά την πάροδο και των 7ημερών, ακολουθεί η διαδικασία χρώσης των αποικιών. Πραγματοποιείται πλύση των τρυβλίων και προσθήκη 3ml μίγματος μεθανόλης –οξικού οξέος σε αναλογία 3:1 σε κάθε φρεάτιο. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους -20° C για 10 λεπτά, έτσι ώστε να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το μίγμα

μεθανόλης–οξικού και τα τρυβλία αφήνονται σε απαγωγό εστία για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 3ml χρωστικής Giemsa/νερό βρύσης σε αναλογία 1:10 και τα τρυβλία τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα περίπου, μέχρι οι αποικίες να υποστούν χρώση. Απορρίπτεται η χρωστική και τα τρυβλία ξεπλένονται με νερό βρύσης πολύ καλά. Όταν στεγνώσουν πραγματοποιείται η μέτρηση των αποικιών. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

2.1.10 Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης

Για την μελέτη της πραγματοποίησης ή μη των αντιδράσεων οξειδωσης-αναγωγής στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, μετά την επώαση των κυττάρων με τα φυτοχημικά και την προσθήκη σισπλατίνης, χρησιμοποιήθηκε το kit Mitochondrial Viability Stain (abcam), το οποίο βασίζεται στη χρήση της χρωστικής (7-Hydroxy-3H-rhenoxazin-3-one 10-oxide). Η χρωστική αυτή έχει μπλε χρώμα το οποίο δεν φθορίζει και όταν η ποσότητά της μειώνεται από τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα μετατρέπεται σε φθορίζουσα, χρώματος μωβ, με απορρόφηση στα 570nm.

Μετά την πάροδο 24 ωρών από τη σπορά 5.000 κυττάρων σε πολυτρυβλία 96 θέσεων ακολουθεί η προσθήκη των συμπλόκων μετάλλων, καθώς και ολιγομυκίνης, ενός αναστολέα της μιτοχονδριακής λειτουργίας που χρησιμοποιήθηκε ως control, σε συγκεντρώσεις μικρότερες, ίσες και μεγαλύτερες από την τιμή IC₅₀. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου είναι τα 105 μl (100 μl DMEM και 5 μl ουσίας). Μετά από επώαση επιπλέον 24 ωρών, προστίθεται η χρωστική (7-Hydroxy-3H-rhenoxazin-3-one 10-oxide) σε αραιώση 1:20 και σε ίση ποσότητα με αυτή που υπάρχει ήδη σε κάθε θέση, δηλαδή 105 μl, και ο τελικός όγκος είναι τα 210 μl. Σε κάποιες θέσεις προστέθηκε μόνο η χρωστική, ενώ υπήρχαν και οι αντίστοιχες θέσεις δειγμάτων στα οποία δεν προστέθηκε καθόλου χρωστική. Μετά από 4 ώρες επώασης στους 37 °C, τα δείγματα μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 570 nm. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

2.2. *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

2.2.1. Υλικά και αντιδραστήρια στην *In vivo* μελέτη

- Curcumin, ≥65% from curcuma longa, C1386, Sigma
- cis-Diammineplatinum(II) dichloride (cisplatin), P4394, Sigma
- Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit, k335-100, της εταιρίας Biovision
- Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, k762-100, της εταιρίας Biovision
- 2-thiobarbituric acid (TBA), ≥98%, T5500, Sigma-Aldrich
- ortho-Phosphoric acid 85%, 79606, Fluka Analytical
- 3-methylbutanol, 59100, Fluka Analytical
- Πολυεστερικές κυβέτες 10mm του οίκου Sarsterdt Co
- Ketamine, της εταιρίας Imalgene
- Σύριγγες 1ml, 25G, της εταιρίας BD

2.2.2. Σχεδιασμός πειράματος για την *in vivo* μελέτη

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 50 λευκοί θηλυκοί επίμυες (*Rattus norvegicus*), ηλικίας 5-6 μηνών και παραπλήσιου βάρους (200 ± 10 g). Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε καθορισμένης σύστασης τροφής (Viozois S.A., Animal Feed Company of Epirus, Greece) και σε πόσιμο νερό. Ο χειρισμός των πειραματόζων έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και την Οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη φροντίδα και χρήση πειραματόζων (Προεδρικό Διάταγμα 160/3-5-1991 άρθρα 13 και 19, Οδηγία 86/609/Ευρωπαϊκού Συμβουλίου).



Εικόνα 22. Φωτογραφία από πειραματόζωο (*Rattus Norvegicus*)

Οι επίμυες χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες και χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις κουρκουμίνης και σισπλατίνης ενδοπεριτοναϊκά όπως περιγράφεται παρακάτω.

1. **Ομάδα ελέγχου** όπου χορηγήθηκε φυσιολογικό ορό ο διαλύτης της σισπλατίνης
2. **Ομάδα Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση 4 mg/kg κουρκουμίνης σωματικού βάρους 2 φορές κάθε 48 ώρες.
3. **Ομάδα Κουρκουμίνης 8 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 8 mg/kg σωματικού βάρους κουρκουμίνης 2 φορές κάθε 48 ώρες.
4. **Ομάδα Κουρκουμίνης 16 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 16 mg/kg σωματικού βάρους κουρκουμίνης 2 φορές κάθε 48 ώρες.

Σε αυτή τη φάση μετά από 24 ώρες έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για να γίνει καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων.

5. **Ομάδα σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 5 mg/ kg σωματικού βάρους σισπλατίνης εφάπαξ μία φορά

Σε αυτή τη φάση μετά από 24 ώρες, έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για την καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων.

6. **Ομάδα σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 20 mg/ kg σωματικού βάρους σισπλατίνης εφάπαξ μία φορά

Σε αυτή τη φάση έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για την καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων

7. **Ομάδα Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 4 mg/kg κουρκουμίνης 2 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης 5 mg/kg
8. **Ομάδα Κουρκουμίνης 8 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 8 mg/kg κουρκουμίνης 2 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 5 mg/kg
9. **Ομάδα Κουρκουμίνης 16 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 16 mg/kg κουρκουμίνης 2 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 5 mg/kg
10. **Ομάδα σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + 4 mg/kg Κουρκουμίνης σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε πρώτα η δόση σισπλατίνης 5 mg/kg και έπειτα ακολούθησαν 2 δόσεις κουρκουμίνης των 4 mg/kg κουρκουμίνης κάθε 24 ώρες
11. **Ομάδα σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + 8 mg/kg Κουρκουμίνης σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε πρώτα η δόση σισπλατίνης 5 mg/kg και έπειτα ακολούθησαν 2 δόσεις κουρκουμίνης των 8 mg/kg κουρκουμίνης κάθε 24 ώρες

12. **Ομάδα σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + 16 mg/kg Κουρκουμίνης σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε πρώτα η δόση σισπλατίνης 5 mg/kg και έπειτα ακολούθησαν 2 δόσεις κουρκουμίνης των 16 mg/kg κουρκουμίνης κάθε 24 ώρες

Σε αυτή τη φάση έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για την καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων

13. **Ομάδα Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 4 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg

14. **Ομάδα Κουρκουμίνης 8 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 8mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg

15. **Ομάδα Κουρκουμίνης 16 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 16 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg

Σε αυτή τη φάση έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για την καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων

16. **Ομάδα Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους** όπου χορηγήθηκε η δόση των 4 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση cisplatin των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 4 mg/kg

17.Ομάδα Κουρκουμίνης 8 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 8mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε η δόση των 8 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση cisplatin των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 8 mg/kg

18.Ομάδα Κουρκουμίνης 16 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 5 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 16mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε η δόση των 16 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 16 mg/kg

Σε αυτή τη φάση έγιναν αιμοληψίες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για την καταμέτρηση μεταβολικών και διατροφικών δεικτών, και κάποια από τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για την λήψη οργάνων.

19.Ομάδα σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνη 4 mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg και μετά από 48ώρες ακολούθησε μία εφάπαξ δόση κουρκουμίνης 4 mg/kg.

20.Ομάδα σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνη 8 mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg και μετά από 48ωρες ακολούθησε μία εφάπαξ δόση κουρκουμίνης 8 mg/kg

21.Ομάδα σισπλατίνης 20 mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνη 16 mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε εφάπαξ δόση σισπλατίνης των 20 mg/kg και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση κουρκουμίνης 16 mg/kg μετά από 48 ώρες.

22.Ομάδα Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 4 mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε η δόση των 4 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση cisplatin των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 4 mg/kg

23.Ομάδα Κουρκουμίνης 8 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 8mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε η δόση των 8 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση cisplatin των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 8 mg/kg

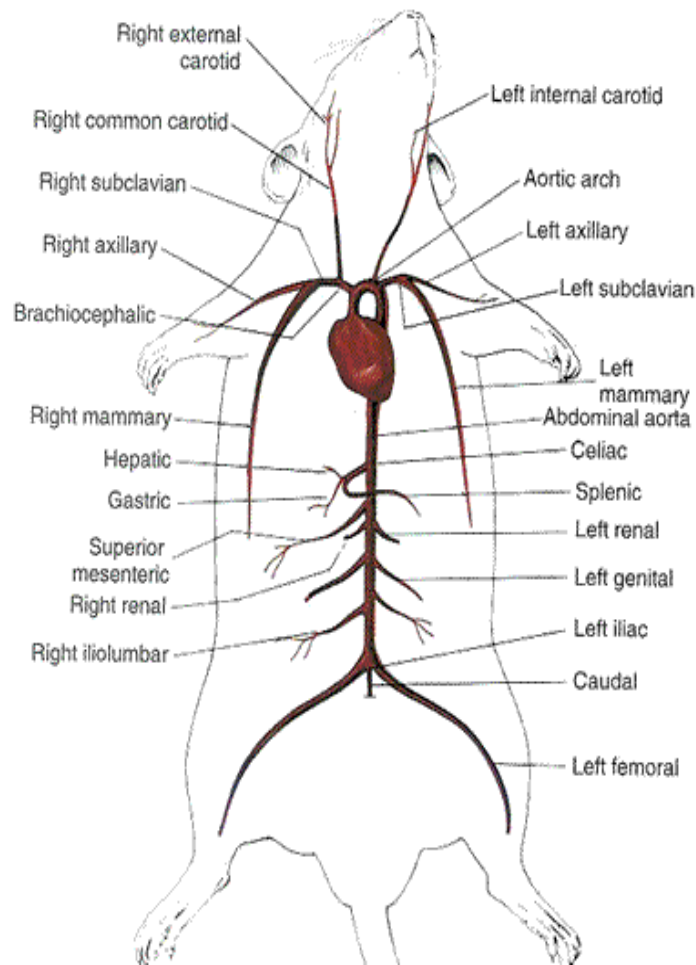
24.Ομάδα Κουρκουμίνης 16 mg/kg σωματικού βάρους + σισπλατίνης 20mg/kg σωματικού βάρους + Κουρκουμίνης 16mg/kg σωματικού βάρους όπου χορηγήθηκε η δόση των 16 mg/kg κουρκουμίνης 3 φορές κάθε 48 ώρες και μετά ακολούθησε μία εφάπαξ δόση cisplatin των 5 mg/kg και ακολούθησε μία δόση κουρκουμίνης 16 mg/kg

Τα πειραματόζωα όπου χορηγήθηκε πρώτα η μεγάλη δόση της σισπλατίνης και μετά έπρεπε να ακολουθήσει η χορήγηση κουρκουμίνης κατέληξαν και δεν ήταν δυνατόν η χορήγηση κουρκουμίνης.

Η τοποθέτηση επίμυων σε μεταβολικούς κλωβούς, ένα πειραματόζωο σε κάθε κλωβό για 24 ώρες, έγινε σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου (25°C), και σε ρυθμισμένες συνθήκες φωτισμού ώστε να υπάρχει σταθερός κύκλος φως:σκοτάδι 12:12 ώρες. Έγινε καταγραφή της τροφής και του νερού που καταναλώθηκε και επίσης μετρήθηκε η αποβολή ούρων και κοπράνων.

Ακολούθησε αιμοληψία. Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε από την σφαγίτιδα και το πειραματόζωο ήταν υπό αναισθησία. Το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένους σωλήνες. Ο όγκος αίματος της κάθε αιμοληψίας καθορίστηκε στα 2ml/πειραματόζωο. Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 3500 στροφές για να γίνει πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ύστερα τοποθετήθηκαν (πλάσμα και ερυθρά) στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

Στα πειραματόζωα όπου θυσιάστηκαν έγινε απομόνωση ζωτικών οργάνων και παθολογοανατομικός έλεγχος των σπλάχνων των πειραματόζωων. Τα ούρα και το αίμα αποθηκεύτηκαν για περεταίρω μελέτες αντιοξειδωτικών ενζύμων.



Εικόνα 23. Απεικόνιση των κυριότερων αρτηριών του επίμουα

2.2.3. Μέτρηση οξειδωσης λιπιδίων

Η οξείδωση λιπιδίων είναι ένας μηχανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και στους ιστούς. Είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες «κλέβουν» ηλεκτρόνια από τα λιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι αλδεΐδες, όπως η μηλονική διαλδεΐδη (MDA). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τελικών προϊόντων της οξειδωσης λιπιδίων

και συγκεκριμένα της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA). Η πιο γνωστή μέθοδος μέτρησης της MDA βασίζεται στην αντίδραση με το θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA).

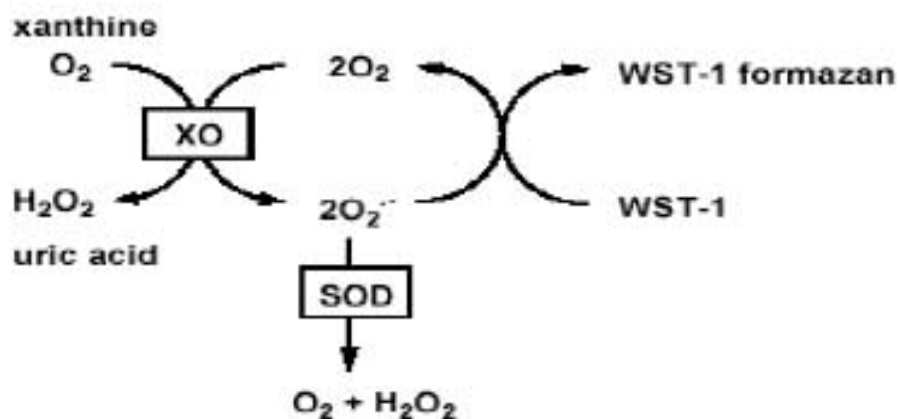
Η παραγωγή των προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων στο δικό μας πείραμα πραγματοποιήθηκε στα ούρα με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA, thiobarbituric acid). Η βαθμονόμηση της οξείδωσης έγινε με τη χρήση μηλονικής διαλδεΐδης (malondialdehyde, MDA) το οποίο αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινο περιβάλλον. Εκατό μικρόλιτρα (100μl) ούρων αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 (50 μl ούρα+ 50 μl νερό) και ύστερα προστέθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με 900μl διαλύματος TBA. Το διάλυμα TBA παρασκευάστηκε με τη διάλυση 0.375gr TBA και 15gr TCA σε 100ml διαλύματος HCl 0.25N. Γίνεται επώαση των δειγμάτων στους 95°C για μια ώρα. Η αντίδραση αποδίδει ένα ροζ MDA-TBA προϊόν. Η αντίδραση διακόπηκε αμέσως με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για 5 λεπτά. Η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 532nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

2.2.4. Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων

2.2.4.1 Δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD)

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) χρησιμοποιήθηκε kit της εταιρίας biovision με κωδικό k335-100. Είναι ένα ευαίσθητο kit που χρησιμοποιεί την WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), το οποίο παράγει μια υδατοδιαλυτή χρώση καθώς ανάγεται από ένα ανιόν υπεροξειδίου. Ο ρυθμός μείωσης του οξειδίου είναι γραμμικός με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) και η οποία αναστέλλεται από την υπεροξειδάση της δισμουτάσης. Συνεπώς, η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της δισμουτάσης μπορεί να μετρηθεί μέσω χρωματομετρικής μεθόδου.

Το υπεροξειδιο της δισμουτάση (SOD) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αναγωγή του ανιόν του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε μοριακό οξυγόνο.



Εικόνα 24. Η αρχή της δράσης της SOD στο SOD Assay Kit (Biovision).

Στη συνέχεια αφού έχουν ξεπαγώσει οι οροί του αίματος, τοποθετούμε 20μl από το δείγμα στα πηγαδάκια και δημιουργούμε και τα δείγματα αναφοράς (blanks). Μετά, προσθέτουμε 200μl από το διάλυμα εργασίας (WST, Working Solution) σε κάθε πηγαδάκι και 20 μl από το διάλυμα του ενζύμου (Enzyme Working Solution) και κάνουμε πολύ καλή ανάδευση. Στη συνέχεια αφήνουμε το τρυβλίο για επώαση για 20 λεπτά στους $37^\circ C$ και πραγματοποιούμε μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm. Αφού υπολογίσαμε τη δραστηριότητα της SOD (ρυθμός αναστολής %), κατασκευάσαμε τα γραφήματα με τα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD.

2.2.4.1. Υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Για την μέτρηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε kit της εταιρίας biovision με κωδικό k762-100. Η οικογένεια των ενζύμων της γλουταθειόνης υπεροξειδάσης (GPx) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική βλάβη. Η GPx μετατρέπει την ανοιγμένη γλουταθειόνη (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), μειώνοντας παράλληλα τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων προς αντίστοιχες αλκοόλες ή τον ελεύθερο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό. Αρκετά ισοένζυμα έχουν βρεθεί σε διαφορετικές κυτταρικές τοποθεσίες, και με διαφορετική ειδικότητα του υποστρώματος. Χαμηλά επίπεδα της GPx συσχετίζονται με διαταραχές ελευθέρων ριζών.

Η μέθοδος βασίζεται στη οξείδωση της γλουταθειόνης σε οξειδωμένη γλουταθειόνη, αντίδραση η οποία καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και η οποία οξειδωμένη γλουταθειόνη ανάγεται πάλι σε γλουταθειόνη μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και τη χρήση NADPH. Η μείωση του NADPH (μετριέται εύκολα στα 340 nm) είναι ανάλογη με τη δραστηριότητα της GPx.

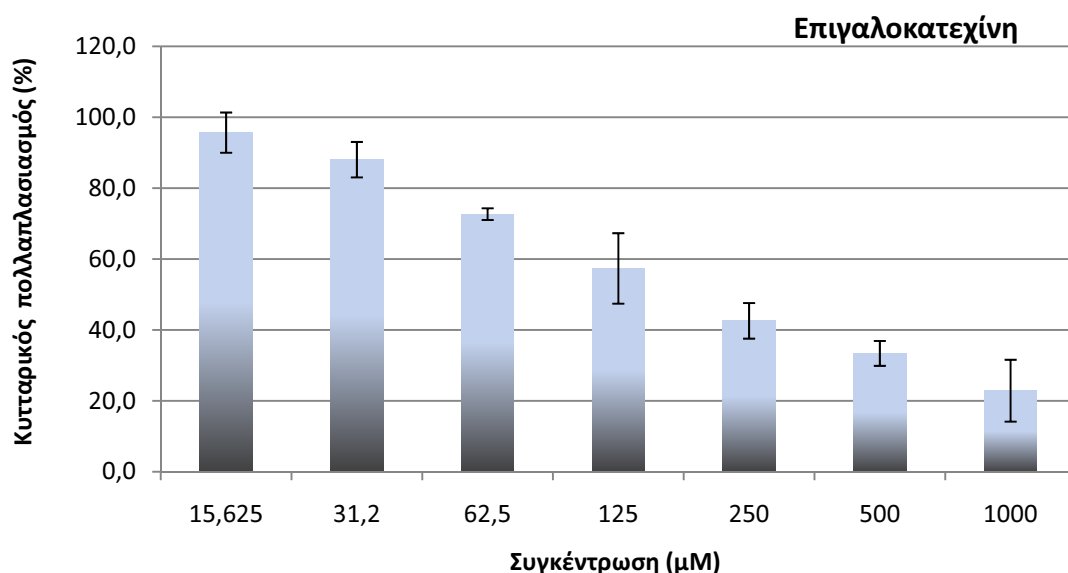
Αρχικά, ετοιμάζονται τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του NADPH. Κατόπιν, τοποθετούμε τα δείγματα μας στα πηγαδάκια μαζί με τα θετικά control (GPx Positive Control) και τα δείγματα αναφοράς. Στην αρχή, τοποθετούμε 50μl από τα δείγματα μας σε κάθε πηγαδάκι (μετά από δοκιμή, ώστε οι μετρήσεις να είναι εντός του εύρους της πρότυπης καμπύλης). Στη συνέχεια, προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι 40 μl από το μείγμα αντίδρασης, που έχουμε προετοιμάσει, και το οποίο περιέχει (για κάθε φρεάτιο) 33μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας (GPx Assay Buffer), 3 μl διαλύματος 40 mM NADPH, 2 μl διαλύματος αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR Solution) και 2 μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH Solution). Αφού αναδεύσουμε καλά, αφήνουμε τα δείγματα για επώαση για 15 λεπτά, ώστε να εξαντληθούν όλα τα αποθέματα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στο δείγμα. Στο σημείο πραγματοποιούμε μέτρηση της απορρόφησης στα 340 nm για να σιγουρευτούμε ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα NADPH για την αντίδραση, και αν χρειάζεται προσθέτουμε επιπλέον ποσότητα NADPH σε κάθε δείγμα. Μετά, προσθέτουμε 10 μl διαλύματος υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (Cumene Hydroperoxide Solution), ώστε να εκκινήσει η αντίδραση της GPx. Αφού αναμείξουμε καλά, πραγματοποιούμε τις μετρήσεις μας στα 340 nm. Τέλος, από τις μετρήσεις και για συγκεκριμένο χρόνο αντίδρασης, υπολογίζουμε τη δραστηριότητα της GPx στα δείγματα μας.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

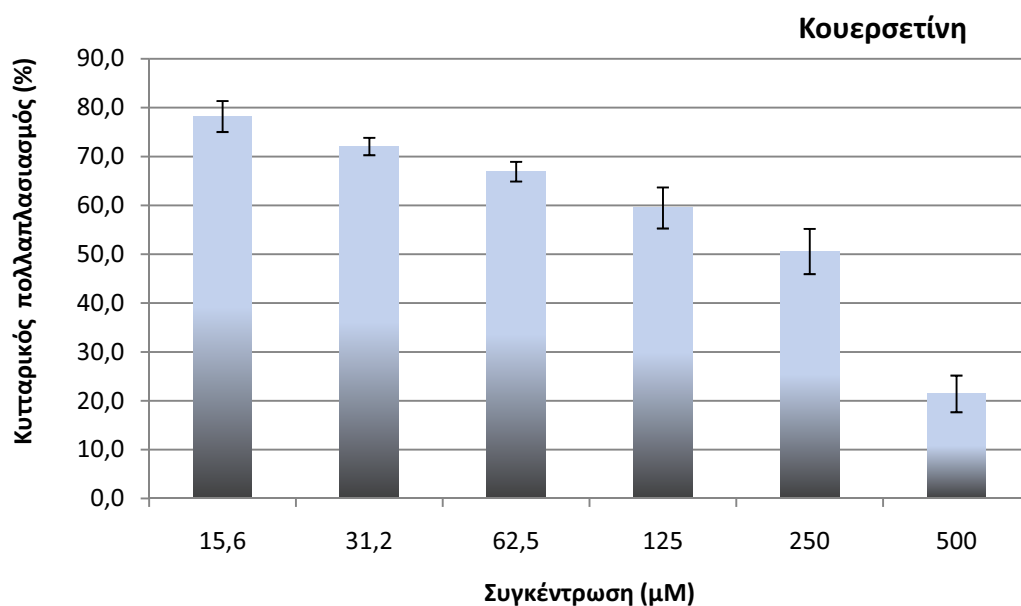
3.1 *in vitro* ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.1 Αποτελέσματα επιβίωσης κυτταρικής σειράς LMS

Στα γραφήματα 1, 2, 3, και 4 απεικονίζεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη και ναρινγίνη. Η επιγαλοκατεχίνη και η κουερσετίνη εμφάνισαν την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από τα τέσσερα φλαβονοειδή, που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, το Γράφημα 1 απεικονίζει τη κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης (15.6-1000 μ M). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 208.9 \pm 15.5 μ M για 48ώρη επώαση με την επιγαλοκατεχίνη. Στο Γράφημα 2 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουερσετίνης (15.6-500 μ M). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 153 \pm 6.5 μ M για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις κουερσετίνης. Συγκεκριμένα, η κουερσετίνη ήταν η ουσία που εμφάνισε ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από την επιγαλοκατεχίνη (27% περισσότερο).

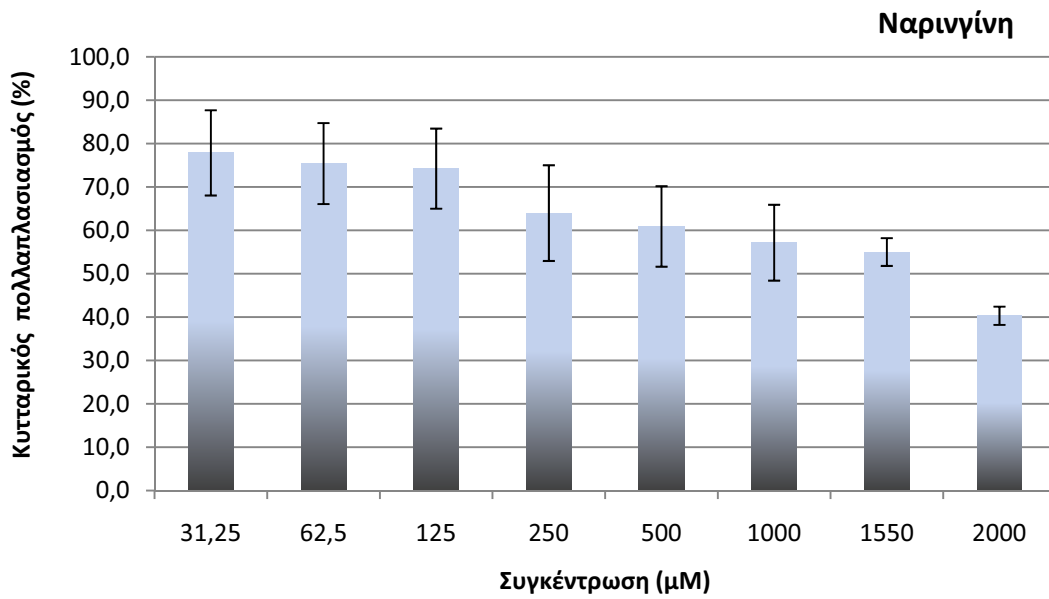


Γράφημα 1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

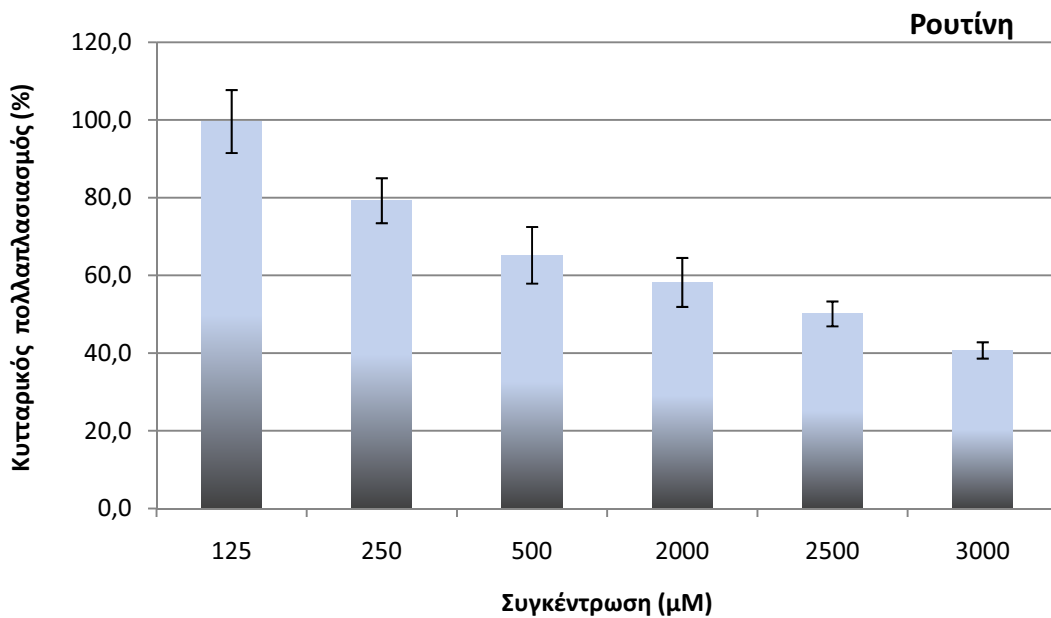


Γράφημα 2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουερσετίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τα φλαβονοειδή ναρινγίνη και ρουτίνη δεν είχαν κάποια ισχυρή δράση στα LMS καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το γράφημα 3 απεικονίζει τη κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναρινγίνης (31.25-2000μM). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 1500 \pm 24.4μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις ναρινγίνης. Στο Γράφημα 4 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ρουτίνης (125-3000μM). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 1993 \pm 27.3μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις ρουτίνης. Αν και η κουερσετίνη, γενικά, συνυπάρχει με την ρουτίνη και η υδρόλυση της ρουτίνης δίνει την κουερσετίνη, παρουσιάζουν τελείως διαφορετικές δράσεις στα LMS κύτταρα. Η κουερσετίνη παρουσιάζει την ισχυρότερη δράση στα καρκινικά LMS κύτταρα και η ρουτίνη την πιο ήπια δράση από τα φλαβονοειδή φυτοχημικά.



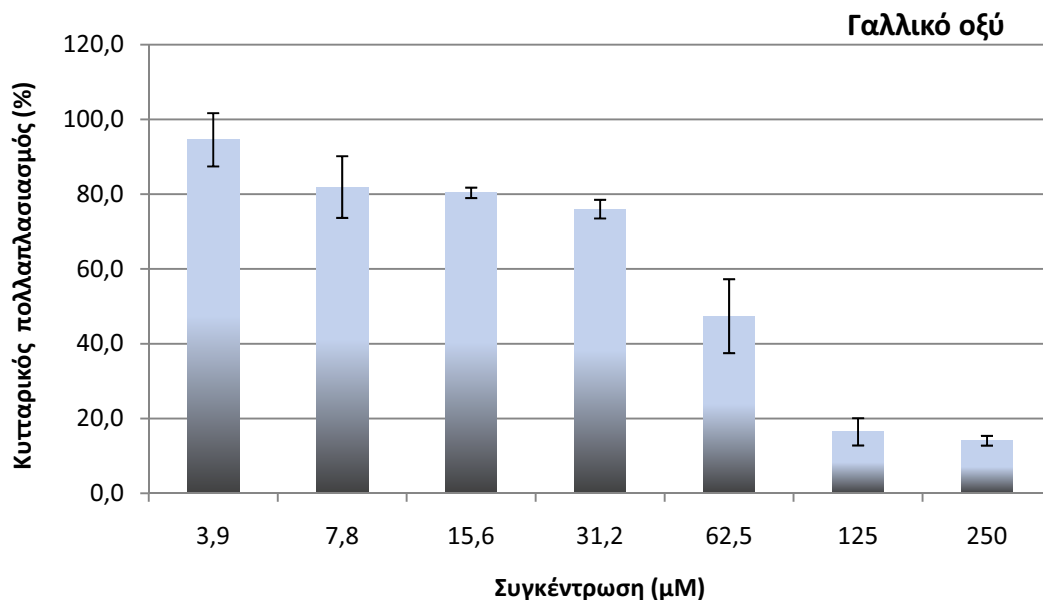
Γράφημα 3. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναρινγίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



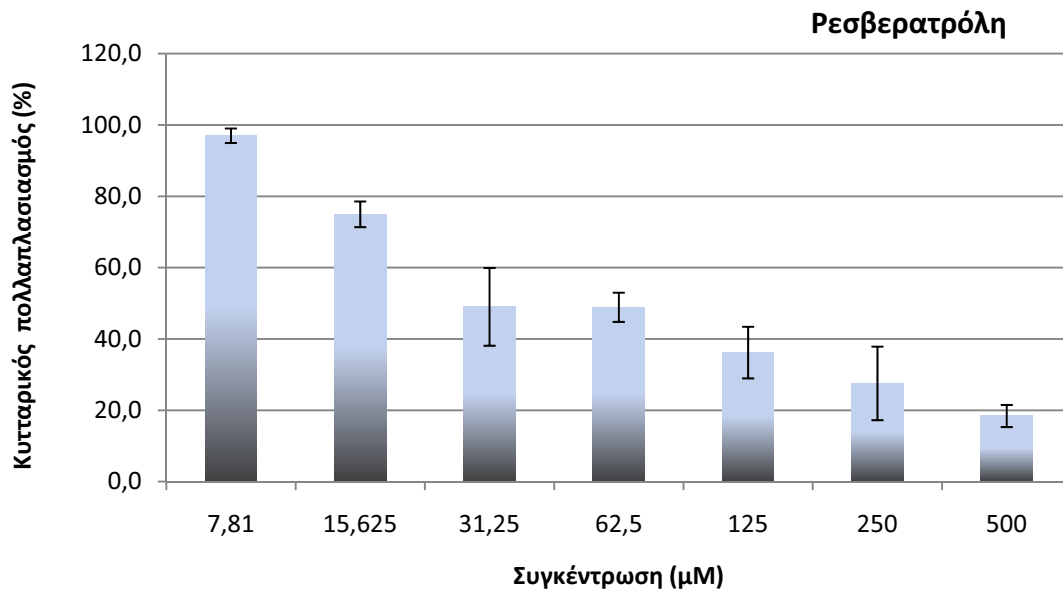
Γράφημα 4. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρουτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

Όσον αφορά τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά, το γαλλικό οξύ είναι μια πολυφαινόλη, που θεωρείται ισχυρή αντιοξειδωτική ένωση. Παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη δράση, ενώ η τιμή IC_{50} της βιωσιμότητας των LMS κυττάρων υπολογίστηκε στα $46.5 \pm 11.5 \mu M$ (Γράφημα 5). Παρόμοια δράση με το γαλλικό οξύ παρουσιάζει και η ρεσβερατρόλη (Γράφημα 6). Η τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης υπολογίστηκε στα $57.4 \pm 8.4 \mu M$.

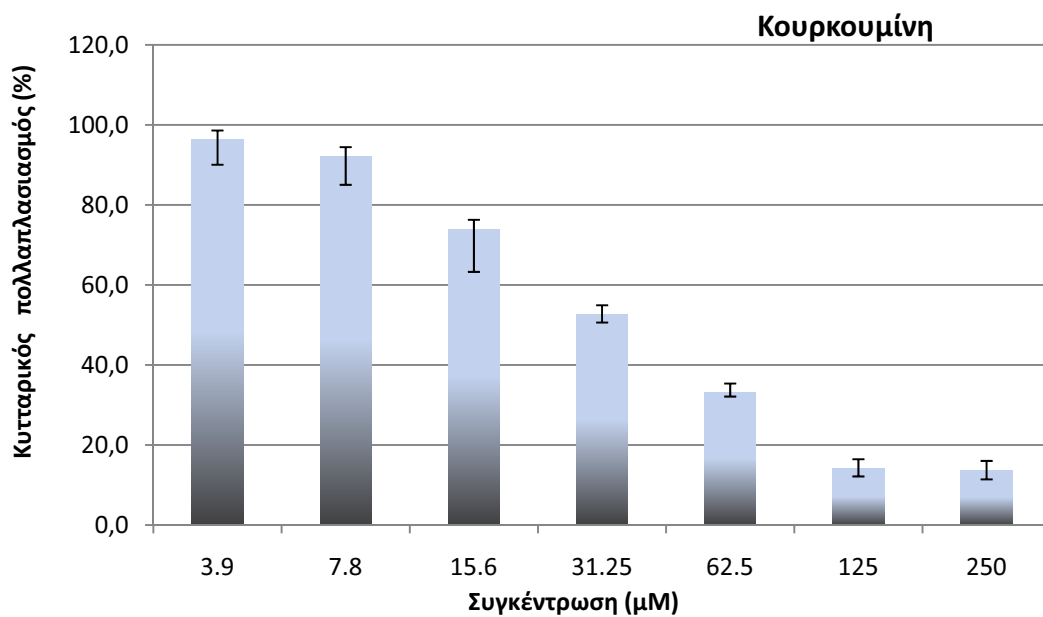
Την πιο ισχυρή δράση από τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά στα LMS κύτταρα παρουσίασε η κουρκουμίνη. Η τιμή IC_{50} υπολογίστηκε στα $27.3 \pm 5.5 \mu M$ για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης (Γράφημα 7).



Γράφημα 5. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 6. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 7. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τις τιμές IC_{50} του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των LMS κυττάρων μετά από 48ώρη επώαση με τα φλαβονοειδή με τη μέθοδο του MTT. Οι τιμές παρουσιάζονται κατά αύξουσα σειρά. Η κουρκουμίνη εμφάνισε την ισχυρότερη δράση, ενώ η ρουτίνη την ασθενέστερη.

Φυτοχημικά	Τιμή IC_{50} (μM)
Κουρκουμίνη	27.3 \pm 5.5
Γαλλικό οξύ	46.5 \pm 11.5
Ρεσβερατρόλη	57.4 \pm 8.4
Κουερσετίνη	153 \pm 6.5
Επιγαλοκατεχίνη	208.9 \pm 15.5
Ναρινγίνη	1500 \pm 24.4
Ρουτίνη	1993 \pm 27.3

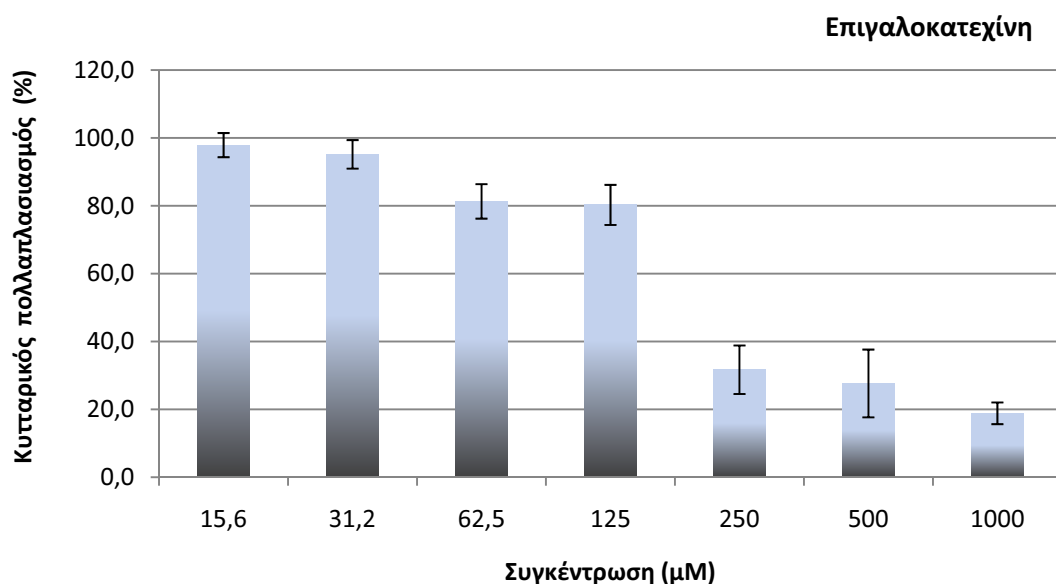
Πίνακας 3. Τιμές IC_{50} για τα LMS κύτταρα μετά από επώαση με τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας συμπεραίνεται ότι τα φυτοχημικά κουρκουμίνη, το γαλλικό οξύ, η ρεσβερατρόλη, η κουερσετίνη και η επιγαλοκατεχίνη παρουσιάζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση στα LMS κύτταρα. Η κουρκουμίνη είναι η ουσία που παρουσιάζει την πιο τοξική δράση στα LMS κύτταρα. Οι ουσίες ναρινγίνη και ρουτίνη παρουσιάζουν πολύ πιο ήπια δράση από τις άλλες ουσίες.

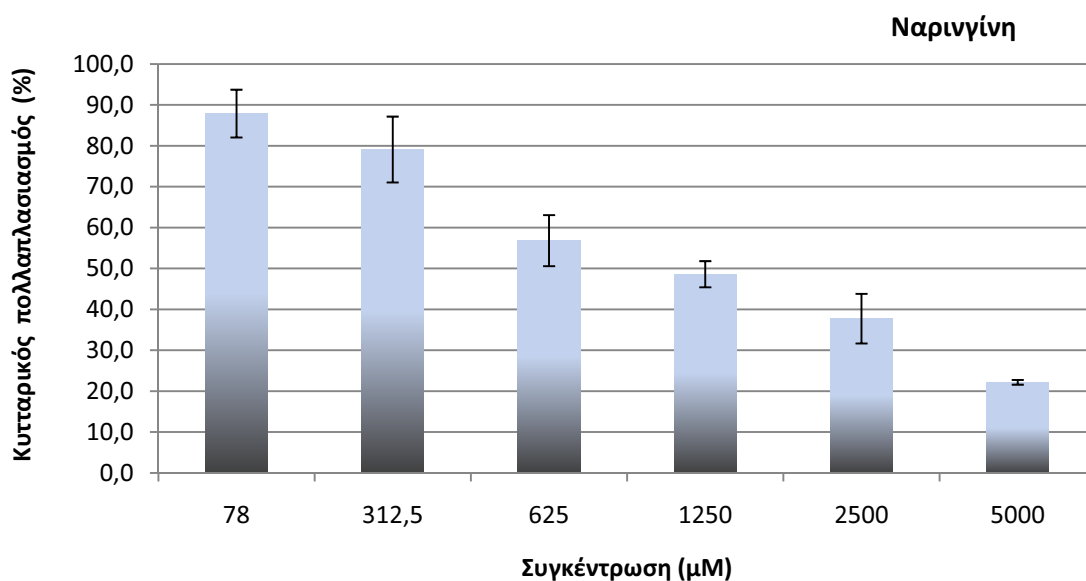
3.1.2 Αποτελέσματα επιβίωσης κυτταρικής σειράς H1299

Η δράση των φυτοχημικών ουσιών μελετήθηκε και στην κυτταρική σειρά H1299, καρκίνου του πνεύμονα, μια σειρά ανθεκτική στην σισπλατίνη.

Στα γραφήματα 8, 9, 10, και 11 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα της H1299 κυτταρικής σειράς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών επιγαλοκατεχίνη, ναρινγίνη, κουερσετίνη και ρουτίνη. Η επιγαλοκατεχίνη και η ναρινγίνη εμφάνισαν την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από τα τέσσερα φλαβονοειδή, που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, το γράφημα 8 απεικονίζει την κυτταρική βιωσιμότητα της H1299 κυτταρικής σειράς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης (15.6-1000μM). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 184.7±31.7μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης. Στο γράφημα 10 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα της H1299 κυτταρικής σειράς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ναρινγίνης (78-500μM). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 767.4±10.3μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις ναρινγίνης. Συγκεκριμένα, η επιγαλοκατεχίνη εμφάνισε ισχυρότερη αντικαρκινική δράση και από την ναρινγίνη (76% περισσότερο). Στην κυτταρική σειρά H1299, η επιγαλοκατεχίνη εμφάνισε την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από τα τέσσερα φλαβονοειδή.

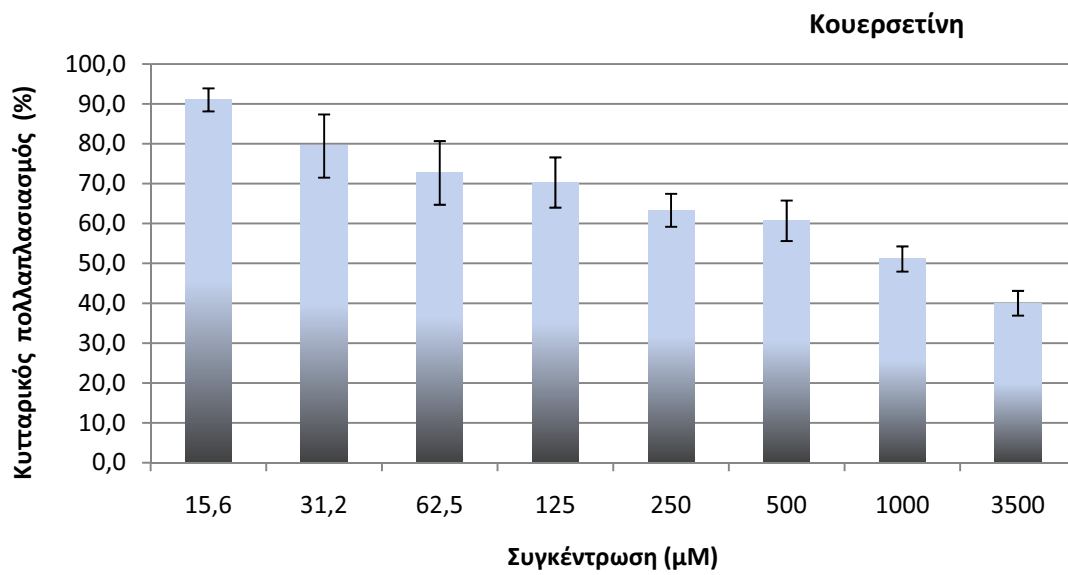


Γράφημα 8. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

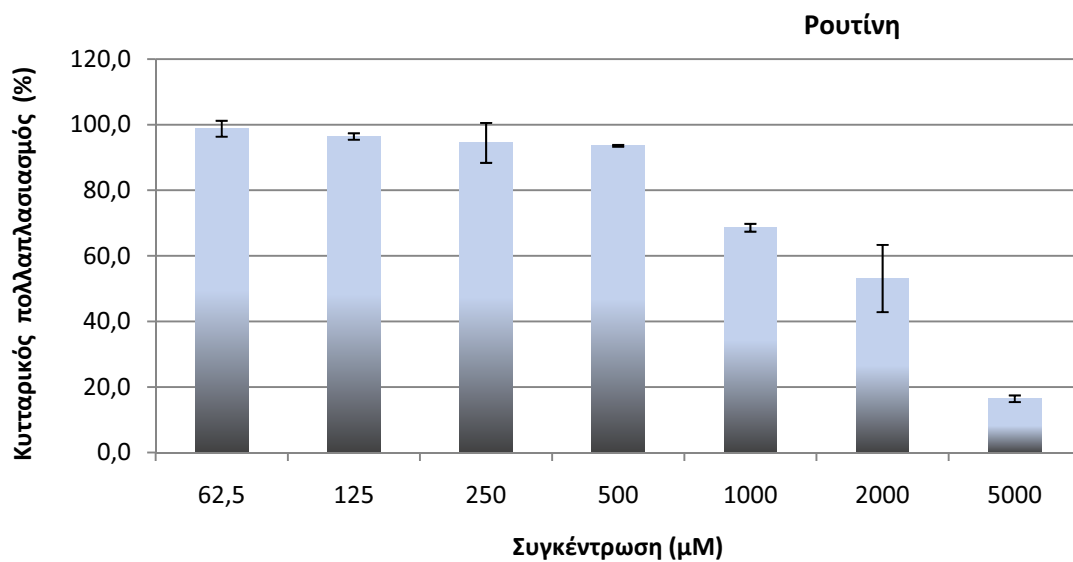


Γράφημα 9. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναρινγίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τα φλαβονοειδή, κουερσετίνη και ρουτίνη, δεν έχουν κάποια ισχυρή δράση στην H1299 κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, το γράφημα 10 απεικονίζει τη κυτταρική βιωσιμότητα των H1299 κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουερσετίνης (15.6-3500μΜ). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 1603 \pm 17.2μΜ για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις κουερσετίνης. Στο γράφημα 11 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα των H1299 κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρουτίνης (62.5-5000μΜ). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 1508 \pm 19.7μΜ για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις ρουτίνης. Στην κυτταρική σειρά του πνεύμονα, η επιγαλοκατεχίνη είναι η πιο δραστική ουσία ενώ η κουερσετίνη παρουσιάζει την πιο ήπια δόση.



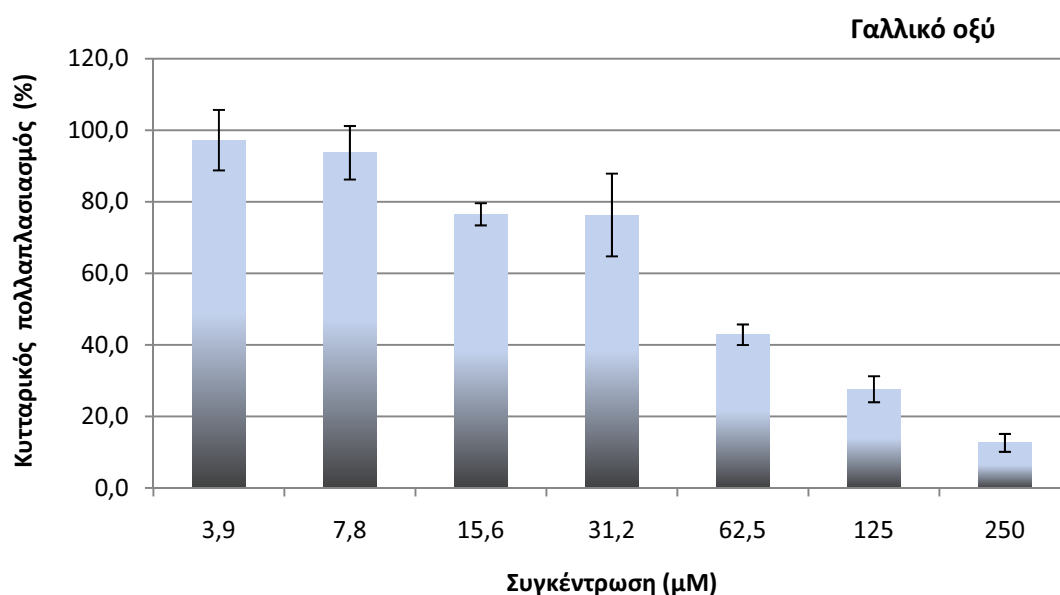
Γράφημα 10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουερσετίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



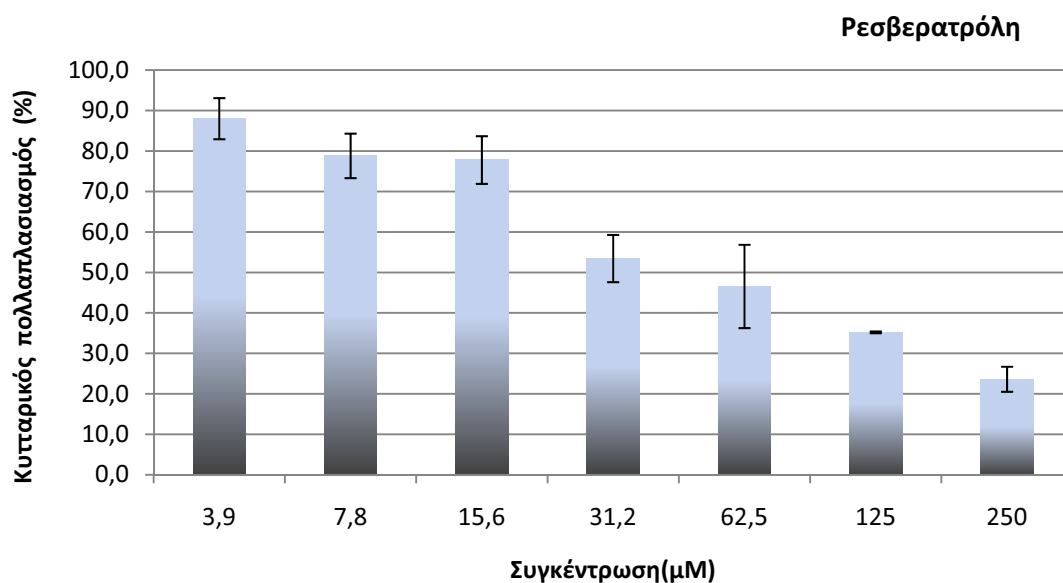
Γράφημα 11. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρουτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Όσον αφορά τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά, το γαλλικό οξύ παρουσιάζει μια ισχυρή δοσοεξαρτώμενη δράση στα H1299 κύτταρα, με τιμή IC_{50} , που υπολογίζεται στα $51.6 \pm 18.4 \mu M$ (γράφημα 12). Παρόμοια δράση με το γαλλικό οξύ παρουσιάζει και η ρεσβερατρόλη (γράφημα 13). Η τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης υπολογίστηκε στα $50.5 \pm 15.3 \mu M$.

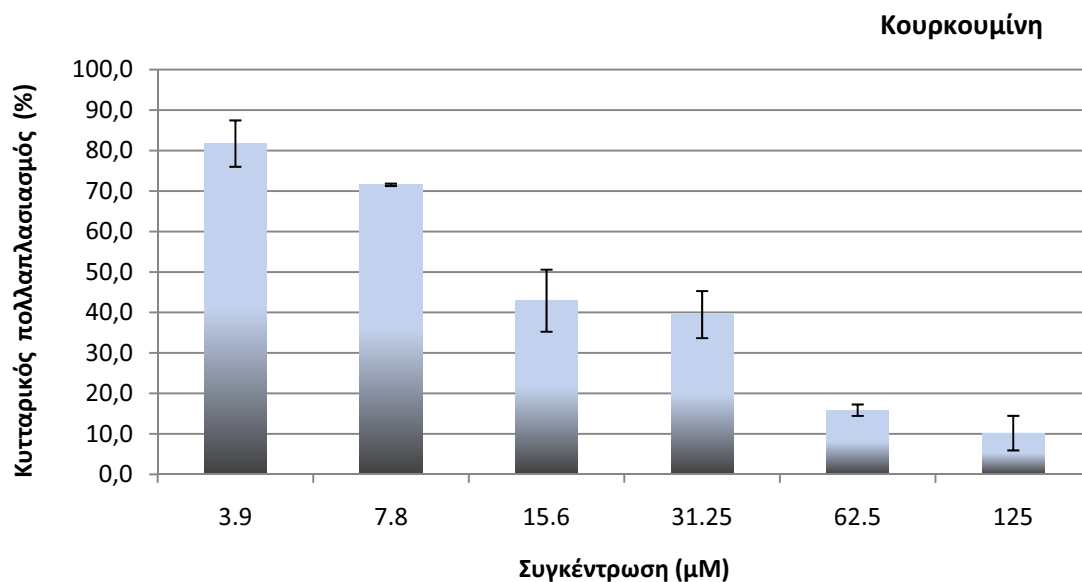
Την πιο ισχυρή δράση από τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά στην κυτταρική σειρά H1299 παρουσίασε η κουρκουμίνη. Η τιμή IC_{50} υπολογίστηκε στα $26 \pm 4 \mu M$ για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης (Γράφημα 14). Και τα τρία αυτά φυτοχημικά παρουσίασαν ίδια εικόνα και στα LMS κύτταρα.



Γράφημα 12. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 13. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 14. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει τις τιμές IC₅₀ της κυτταρικής βιωσιμότητας της H1299 κυτταρικής σειράς μετά από 48ώρη επώαση με τα φλαβονοειδή με τη μέθοδο του MTT. Οι τιμές παρουσιάζονται κατά αύξουσα σειρά. Η κουρκουμίνη εμφάνισε την ισχυρότερη δράση ενώ η κουερσετίνη την ασθενέστερη

Φυτοχημικά	Τιμή IC ₅₀ (μM)
Κουρκουμίνη	26±4
Ρεσβερατρόλη	50.5±15.3
Γαλλικό οξύ	51.6±18.4
Επιγαλοκατεχίνη	184.7±31.7
Ναρινγίνη	767.4±10.3
Ρουτίνη	1508±19.7
Κουερσετίνη	1603±17.2

Πίνακας 4. Τιμές IC₅₀ H1299 κυτταρικής σειράς μετά από επώαση με τα φυτοχημικά

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι στη H1299 κυτταρική σειρά η κουρκουμίνη, η ρεσβερατρόλη, το γαλλικό οξύ, η επιγαλοκατεχίνη, και η ναρινγίνη είναι οι πιο δραστικές ουσίες και έχουν κυτταροτοξική δράση στα H1299 κύτταρα. Η κουρκουμίνη είναι η πιο δραστική ουσία όπως και στα LMS κύτταρα. Η ρουτίνη και η κουερσετίνη έχουν πολύ ήπια δράση στα H1299 κυτταρική σειρά του πνεύμονα.

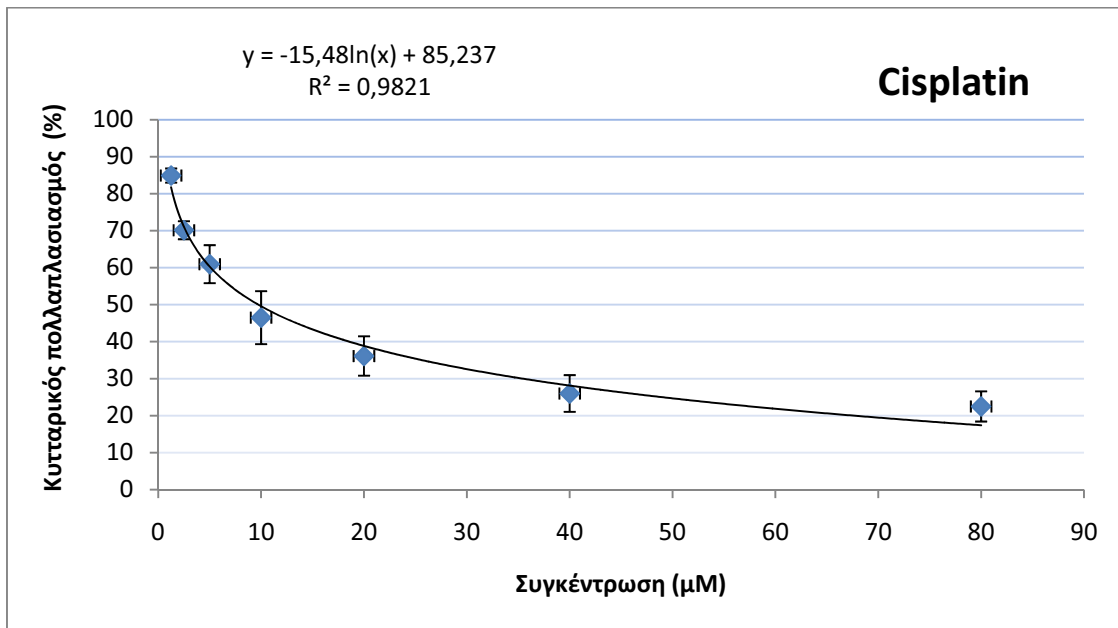
Η κουερσετίνη και η ναρινγίνη είναι ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν επιλεκτικότητα στην κυτταρική σειρά. Η κουερσετίνη παρουσιάζει ισχυρή δράση στα LMS κύτταρα ενώ στα H1299 κύτταρα δεν έχει κάποια δράση. Όσο για την ναρινγίνη παρατηρείται ότι παρουσιάζει ισχυρή δράση στα H1299 κυτταρική σειρά ενώ στα LMS κύτταρα παρουσιάζει πιο ήπια δράση.

3.1.3 Επίδραση φυτοχημικών ουσιών στην δράση της σισπλατίνης

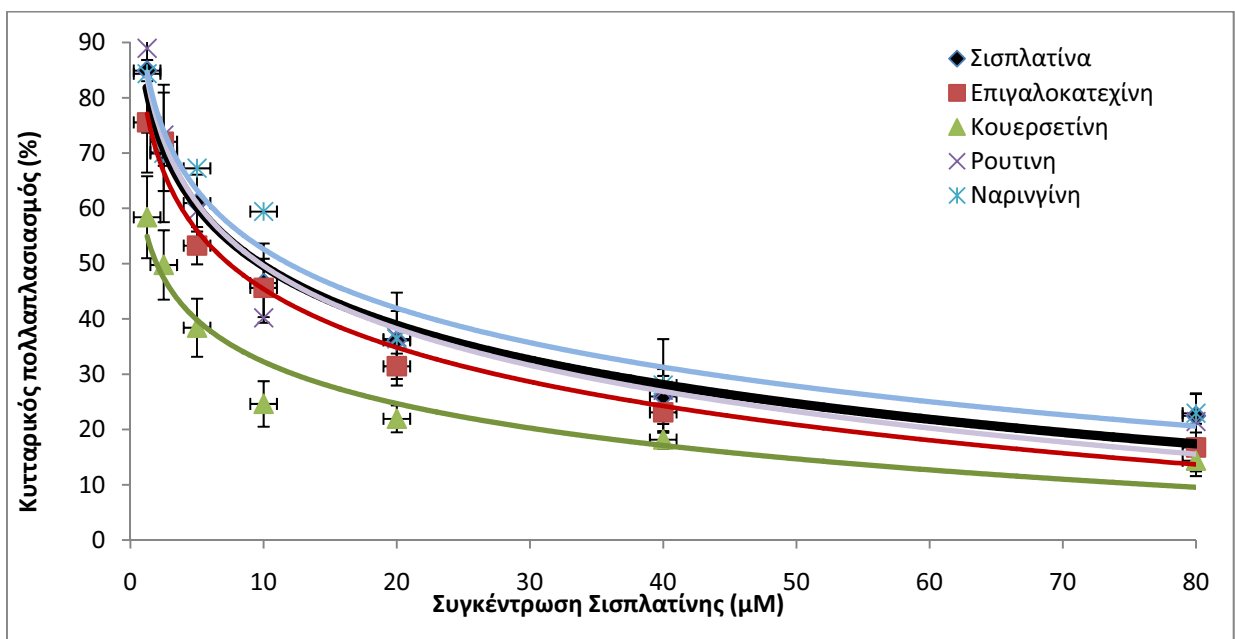
Σε δεύτερη φάση του πειράματος πραγματοποιήθηκε προεπώαση των δυο κυτταρικών σειρών (LMS και H1299) με τα φυτοχημικά και συγκεκριμένα έγινε προεπώαση με 30μM επιγαλοκατεχίνης, κουερσετίνης, ναρινγίνης και ρουτίνης. Για τις ουσίες γαλλικό οξύ και ρεσβερατρόλη πραγματοποιήθηκε προεπώαση με 15μM ουσίας, ενώ για την κουρκουμίνη έγινε προεπώαση με 7.5 μM ουσίας. Μετά από 24 ώρες επώασης με τα φυτοχημικά, έγινε προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1.25-80μM για τα LMS κύτταρα και 7.8-250 μM για την κυτταρική σειρά H1299.

Στο γράφημα 15 παρουσιάζεται η καμπύλη της σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της στα LMS κύτταρα. Στο γράφημα 16 παρουσιάζεται η καμπύλη της σισπλατίνης (με έντονη μαύρη γραμμή), καθώς και η καμπύλη κυτταρικού πολλαπλασιασμού των LMS κυττάρων μετά από προεπώαση με τα φυτοχημικά και μετέπειτα προσθήκης σισπλατίνης. Η τιμή IC₅₀ για τη σισπλατίνη στα LMS κύτταρα υπολογίστηκε στην συγκέντρωση 8.6±1.1μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις της. Παρατηρείται μια αύξηση στη δράση της σισπλατίνης, όταν τα κύτταρα προεπωάζονται με επιγαλοκατεχίνη και κουερσετίνη. Όταν τα κύτταρα προεπωάζονται με ναρινγίνη και ρουτίνη, παρατηρείται μείωση στη δράση της σισπλατίνης. Συγκεκριμένα, μετά την προεπώαση με επιγαλοκατεχίνη η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στην συγκέντρωση 6.6±3.8μM. Μετά την προεπώαση με κουερσετίνη η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 2.3±1.2μM. Μετά από προεπώαση με ρουτίνη η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στην συγκέντρωση 10.1±4.1μM. Μετά την προεπώαση με ναρινγίνη η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 12.3±4.5 μM. Η κουερσετίνη είναι η ουσία η οποία έφερε τη μεγαλύτερη αύξηση στη δραστικότητα της σισπλατίνης από τα флаβονοειδή φυτοχημικά (73% αύξηση).

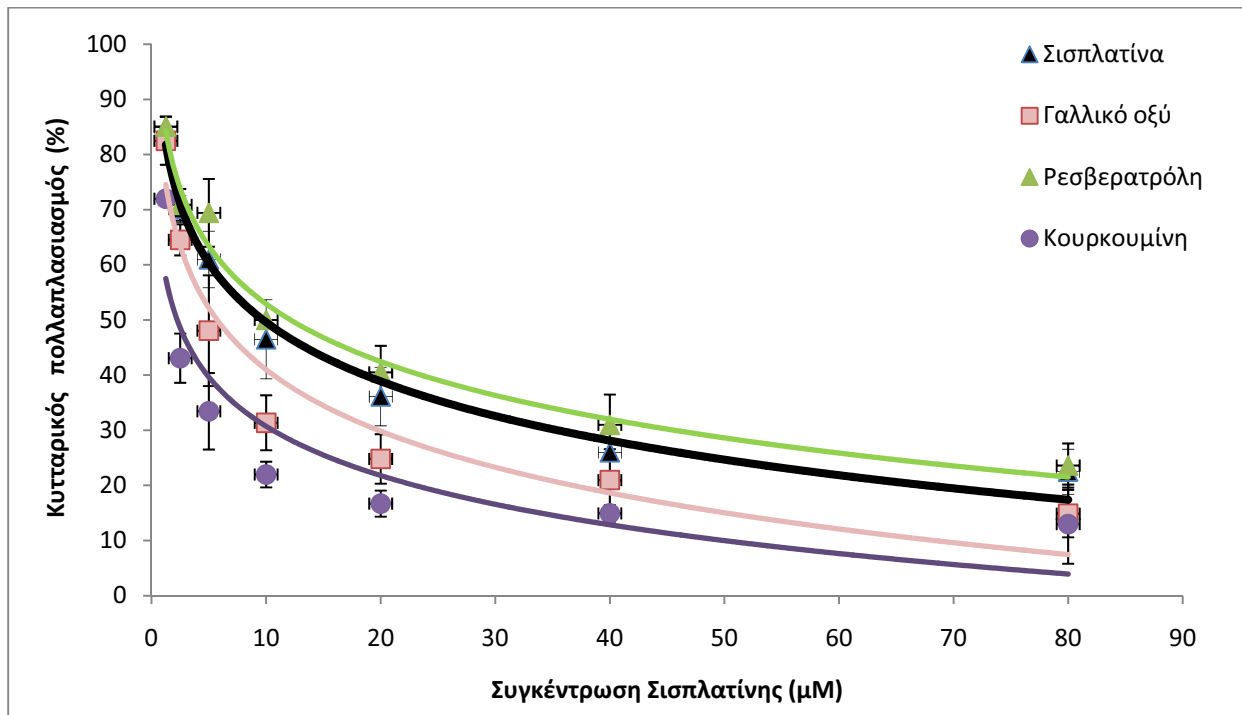
Στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται αύξηση της κυτταροτοξικότητας, προεπωάζοντας με τα φυτοχημικά, σημαίνει ότι θα χρειαστεί η χορήγηση μικρότερης δόσης της σισπλατίνης για να επιτευχθεί η τιμή IC₅₀ της.



Γράφημα 15. Καμπύλη κυτταρικής σειράς LMS μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 16. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς LMS μετά από προεπίωση με τα φλαβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη, ναρινγίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α



Γράφημα 17. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς LMS μετά από προεπάωση με τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά γαλλικό οξύ, ρεσβερατρόλη και κουρκουμίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο γράφημα 17 παρουσιάζεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων, μετά από προεπάωση με τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά και έπειτα προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων της σισπλατίνης. Με έντονη μαύρη γραμμή απεικονίζεται η καμπύλη της σισπλατίνης. Παρατηρείται μια αύξηση στη δράση της σισπλατίνης, όταν προεπώαζουμε τα κύτταρα με το γαλλικό οξύ και την κουρκουμίνη. Συγκεκριμένα, μετά την προεπάωση με το γαλλικό οξύ, η τιμή IC_{50} της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση $6.3 \pm 2.2 \mu M$. Μετά από προεπάωση με την κουρκουμίνη η τιμή IC_{50} της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση $3.1 \pm 0.8 \mu M$. Όσον αφορά την ρεσβερατρόλη η προεπάωση με αυτήν έφερε μια μείωση στη δράση της σισπλατίνης, με την τιμή IC_{50} της σισπλατίνης να υπολογίζεται στη συγκέντρωση $12.8 \pm 1.8 \mu M$. Η κουρκουμίνη είναι η ουσία, η οποία έφερε τη μεγαλύτερη αύξηση στη δραστικότητα της σισπλατίνης από τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά (63% αύξηση).

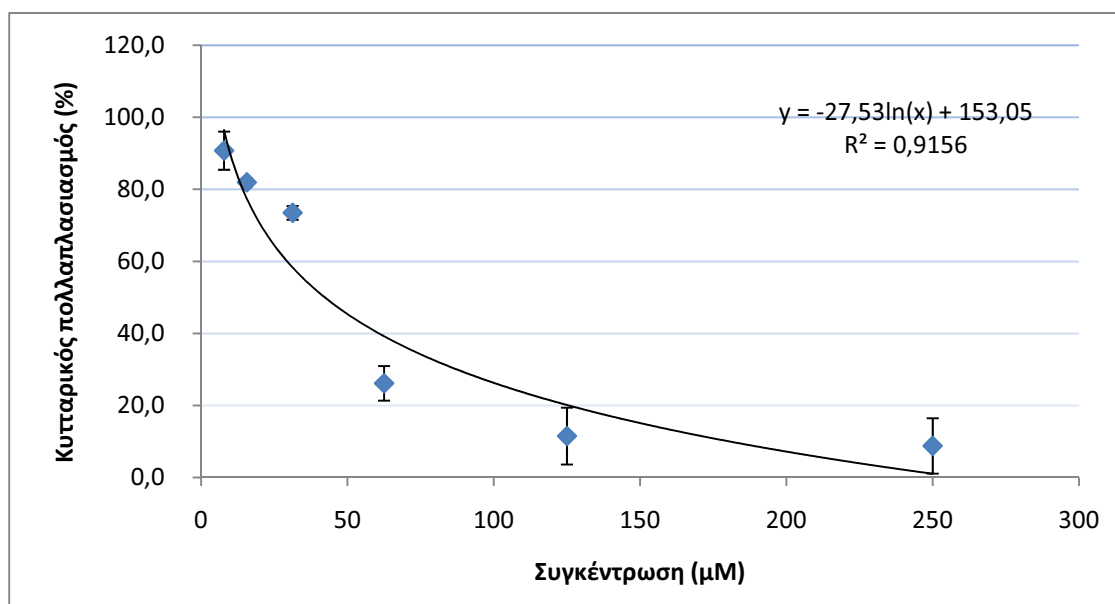
Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τις τιμές IC₅₀ της κυτταρικής βιωσιμότητας της LMS κυτταρικής σειράς μετά από προεπώαση με τα φυτοχημικά και ακολούθως προσθήκης σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις για 48 ώρες, με τη μέθοδο του MTT. Οι τιμές παρουσιάζονται κατά αύξουσα σειρά. Η κουερσετίνη είναι η ουσία που ενισχύει πιο πολύ την δράση της σισπλατίνης.

Φυτοχημικά +Σισπλατίνη	Τιμή IC ₅₀ (μM)
Κουερσετίνη	2.3±1.2
Κουρκουμίνη	3.1±0.8
Γαλλικό οξύ	6.3±2.2
Επιγαλοκατεχίνη	6.6±3.8
Ρουτίνη	10.1±4.1
Ναρινγίνη	12.3±4.5
Ρεσβερατρόλη	12.8±1.8

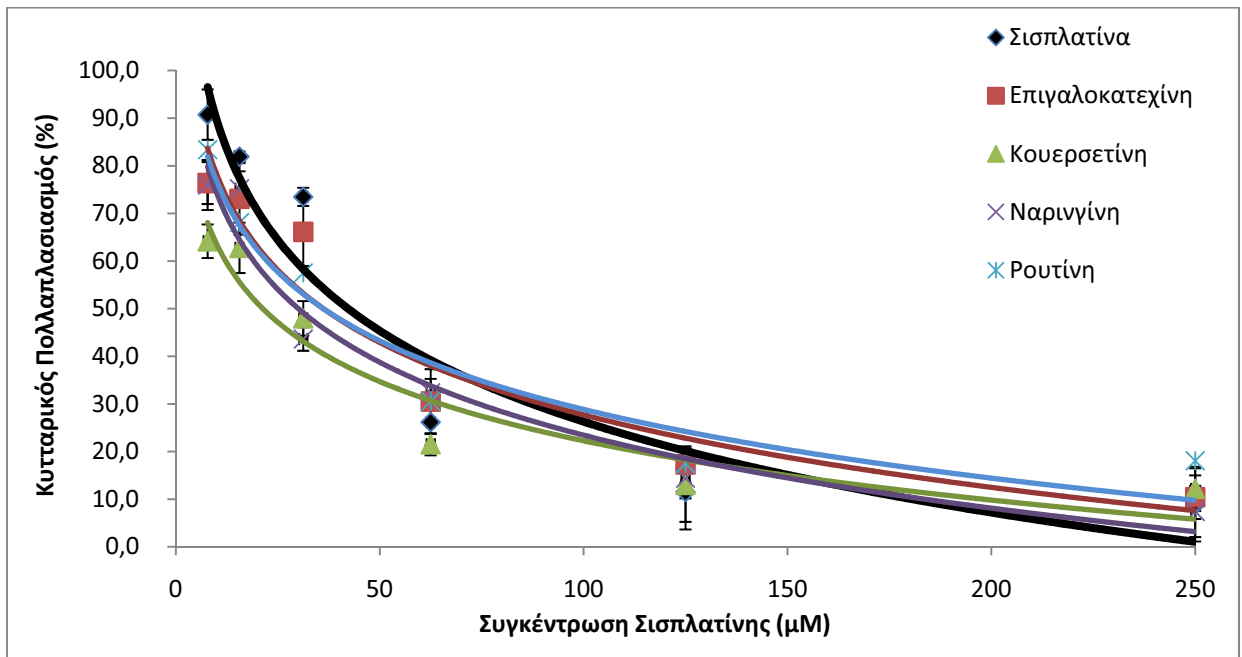
Πίνακας 5. Τιμές IC₅₀ μετά από προεπώαση των LMS κυττάρων με τα φυτοχημικά και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, παρατηρείται ότι προεπώαση των LMS κυττάρων με πολύ μικρή και μη τοξική δόση φυτοχημικών, όπως η κουερσετίνη, η κουρκουμίνη, το γαλλικό οξύ και η επιγαλοκατεχίνη, αυξάνει τη κυτταροτοξική δράση της σισπλατίνης. Από τα αποτελέσματα μας αυτά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι μετά από προεπώαση με φυτοχημικά απαιτείται χορήγηση μικρότερης δόσης της σισπλατίνης για να επιτευχθεί θάνατος των κυττάρων στο 50% (IC₅₀).

Στο γράφημα 18 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα της H1299 κυτταρικής σειράς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης. Στο γράφημα 19 παρουσιάζεται το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των H1299 κυττάρων μετά από προεπώαση με τα φυτοχημικά και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης. Η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης για τα H1299 κύτταρα, υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 43.0±6.8μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις της. Παρατηρείται μια αύξηση στη δράση της σισπλατίνης, όταν προεπώαζουμε τα κύτταρα και με τα τέσσερα флаβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ναρινγίνη και ρουτίνη. Συγκεκριμένα, μετά την προεπώαση με επιγαλοκατεχίνη, η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 37.3±9.1μM. Μετά την προεπώαση με τη κουερσετίνη, η τιμή του IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 23.3±5.1μM. Μετά από την προεπώαση με τη ρουτίνη, η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 36.8±5.4μM. Μετά την προεπώαση με ναρινγίνη, η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 30.9±5.3μM. Όπως και στα LMS κύτταρα, η κουερσετίνη είναι το флаβονοειδές, που έφερε τη μεγαλύτερη αύξηση στη δραστικότητα της σισπλατίνης συγκριτικά με τα флаβονοειδή φυτοχημικά (46% αύξηση).



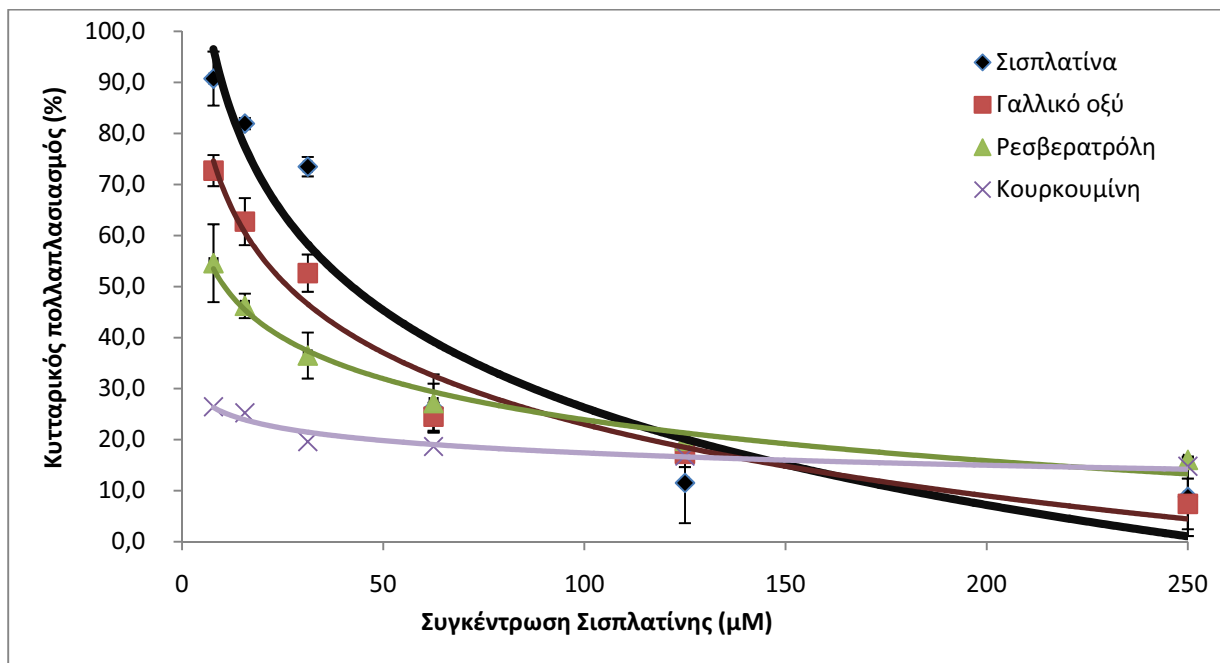
Γράφημα 18. Καμπύλη κυτταρικής σειράς H1299 μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Σισπλατίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.



Γράφημα 19. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από προεπάση με τα φλαβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη, ναρινγίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο γράφημα 20 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των H1299 κυττάρων, μετά από προεπάση με τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης. Με έντονη μαύρη γραμμή απεικονίζονται η συγκέντρωση της σισπλατίνης. Παρατηρείται μια αύξηση στη δράση της σισπλατίνης, όταν προεπώζουμε τα κύτταρα με το γαλλικό οξύ, την ρεσβερατρόλη και την κουρκουμίνη. Συγκεκριμένα, μετά από την προεπάση με το γαλλικό οξύ, η τιμή IC_{50} της σισπλατίνης, υπολογίστηκε στη συγκέντρωση $27.1 \pm 4.7 \mu M$. Μετά την προεπάση με την ρεσβερατρόλη, η τιμή IC_{50} της σισπλατίνης υπολογίστηκε στο $11.3 \pm 4.5 \mu M$. Μετά από προεπάση με κουρκουμίνη, η τιμή IC_{50} της σισπλατίνης, υπολογίστηκε στη συγκέντρωση $21.2 \pm 3.3 \mu M$.

Παρατηρείται διαφορά μεταξύ LMS και H1299 κυττάρων όταν προεπώζουμε με την ρεσβερατρόλη. Η ρεσβερατρόλη προκαλεί μεγαλύτερη ενίσχυση στην τοξικότητα της σισπλατίνης στα H1299 κυτταρική σειρά από ότι στα LMS κύτταρα.



Γράφημα 20. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς H1299 μετά από προεπώαση με τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά γαλλικό οξύ, ρεσβερατρόλη, κουρκουμίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

Ο Πίνακας 6 παρουσιάζει τις τιμές του IC_{50} της κυτταρικής βιωσιμότητας της H1299 κυτταρικής σειράς μετά από προεπώαση με τα φυτοχημικά και ακολούθως προσθήκης σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις για 48 ώρες, με τη μέθοδο του MTT. Οι τιμές παρουσιάζονται κατά αύξουσα σειρά.

Φυτοχημικά +Σισπλατίνη	Τιμή IC_{50} (μΜ)
Ρεσβερατρόλη	11.3 \pm 4.5
Κουρκουμίνη	21.2 \pm 3.3
Κουερσετίνη	23.3 \pm 5.1
Γαλλικό οξύ	27.1 \pm 4.7
Ναρινγίνη	30.9 \pm 5.3
Ρουτίνη	36.8 \pm 5.4
Επιγαλοκατεχίνη	37.3 \pm 9.1

Πίνακας 6. Τιμές IC_{50} μετά από προεπώαση των H1299 κυττάρων με τα φυτοχημικά, και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, παρατηρείται ότι προεπώαση των H1299 κυττάρων με μια πολύ μικρή και μη τοξική δόση όλων των φυτοχημικών, αύξησαν την κυτταροτοξική δράση της σισπλατίνης. Από τα αποτελέσματα μας αυτά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι μετά από προεπώαση με φυτοχημικά απαιτείται χορήγηση μικρότερης δόσης της σισπλατίνης για να επιτευχθεί θάνατος των κυττάρων στο 50% (IC₅₀) στα H1299 κυτταρική σειρά.

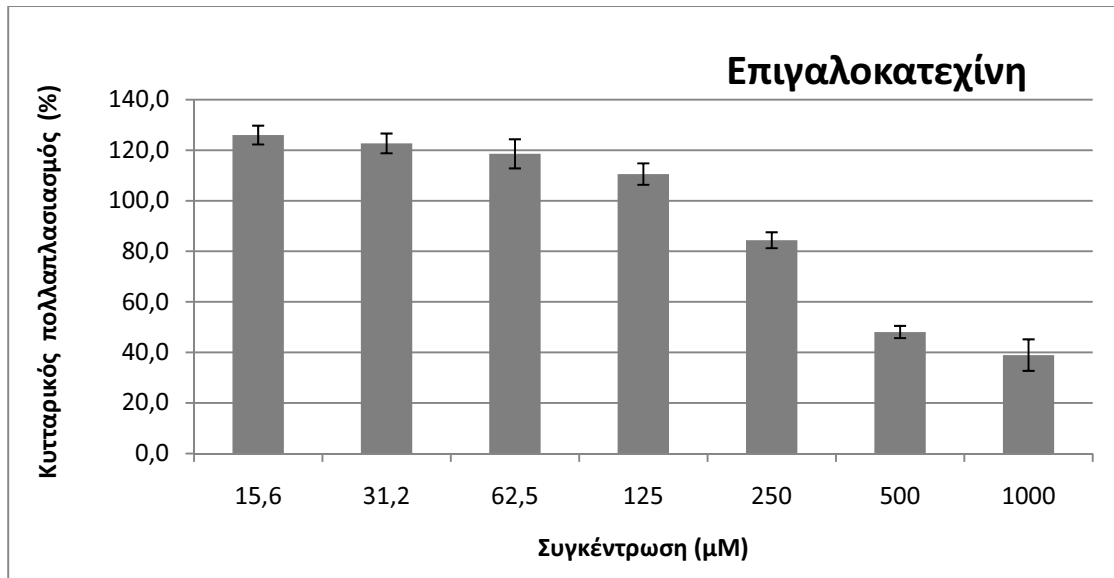
3.1.4 Αποτελέσματα επιβίωσης της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλάστες

Σε μια επόμενη φάση πειραμάτων μελετήθηκε η δράση των φυτοχημικών ουσιών, της σισπλατίνης, και του συνδυασμού σισπλατίνης και φυτοχημικών στην φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC-5 (ινοβλάστες). Σκοπός είναι να δούμε την συμπεριφορά των ουσιών αυτών και σε μια φυσιολογική σειρά, έτσι ώστε να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη δράση τους.

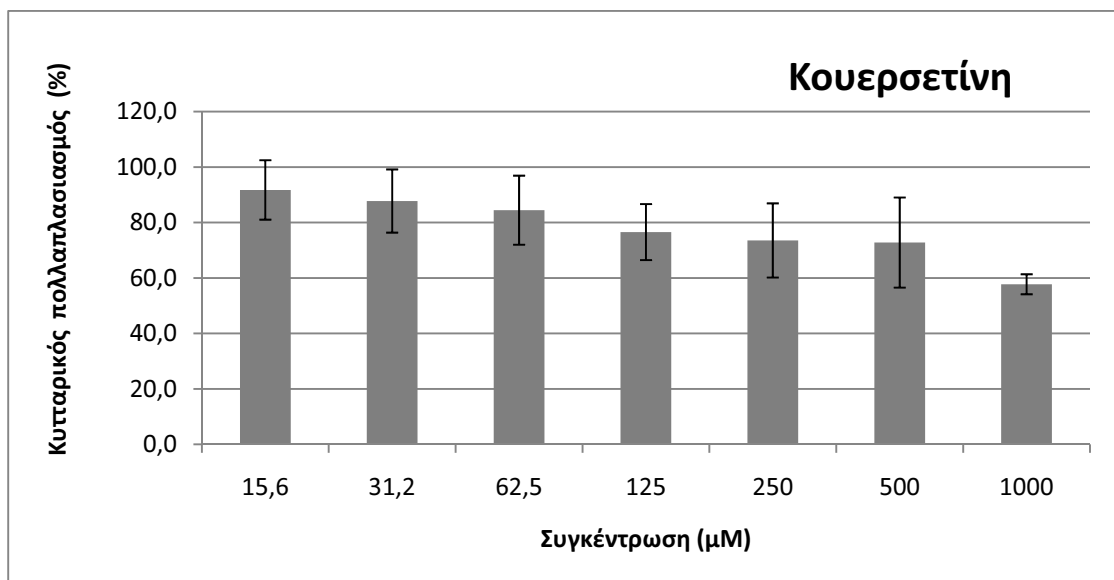
Στα γραφήματα 21, 22, 23 και 24 απεικονίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα των MRC-5 κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη και ναρινγίνη. Συγκεκριμένα, το γράφημα 21 απεικονίζει τη κυτταρική βιωσιμότητα των MRC-5 κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης (15.6-1000μM). Παρατηρείται ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της επιγαλοκατεχίνης (1000μM) η επιβίωση των MRC-5 κυττάρων είναι περίπου 40%, ενώ στις καρκινικές κυτταρικές σειρές η επιβίωση των κυττάρων στην ίδια συγκέντρωση είναι μικρότερη και γύρω στο 20%. Όσον αφορά την κουερσετίνη, στη μεγαλύτερη της συγκέντρωση (1000μM), η επιβίωση των MRC-5 κυττάρων είναι περίπου 60%, ενώ στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, η επιβίωση των κυττάρων στην ίδια συγκέντρωση είναι μικρότερη και περίπου στο 50%. Το φυτοχημικό ναρινγίνη χορηγήθηκε στα MRC-5 κύτταρα σε συγκεντρώσεις από (78-5000μM) και η επιβίωση των ινοβλαστών στη συγκέντρωση των 5000μM υπολογίστηκε στο 40%. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της ναρινγίνης (1000μM) η επιβίωση των MRC-5 κυττάρων είναι περίπου 40%, ενώ στις καρκινικές κυτταρικές σειρές η επιβίωση των κυττάρων στην ίδια συγκέντρωση είναι μικρότερη και περίπου 20%. Η χορήγηση της ρουτίνης στη μεγαλύτερη της συγκέντρωση

4000 μ M είχε ως αποτέλεσμα επιβίωση των MRC-5 κυττάρων 70%. Η επιβίωση καρκινικών κυττάρων είναι μικρότερη από αυτό το ποσοστό.

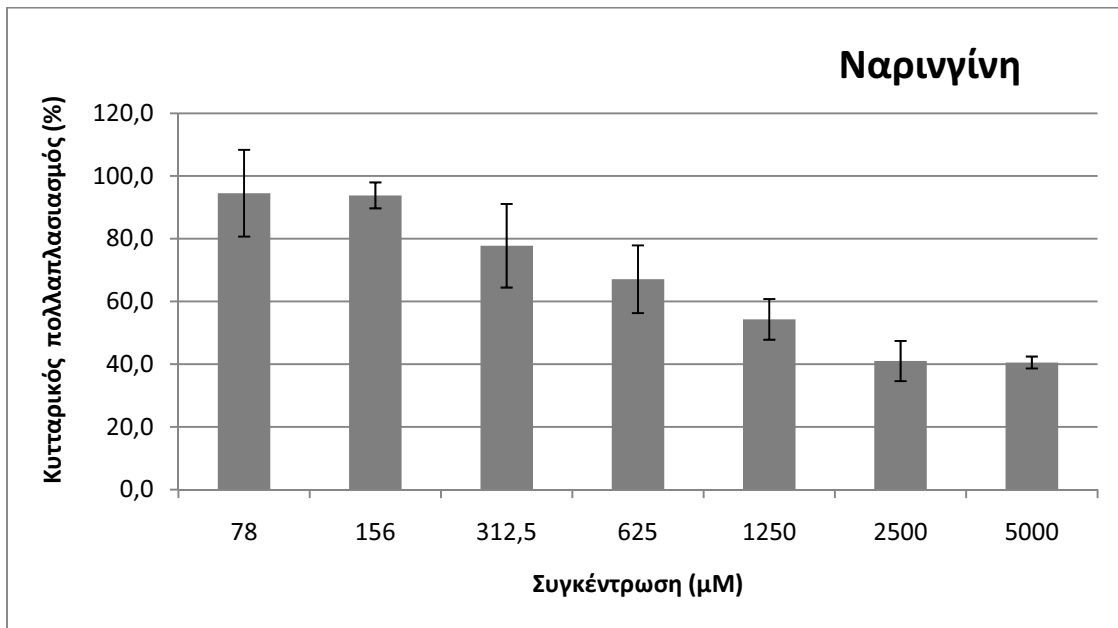
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας τα флаβονοειδή έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, και δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα.



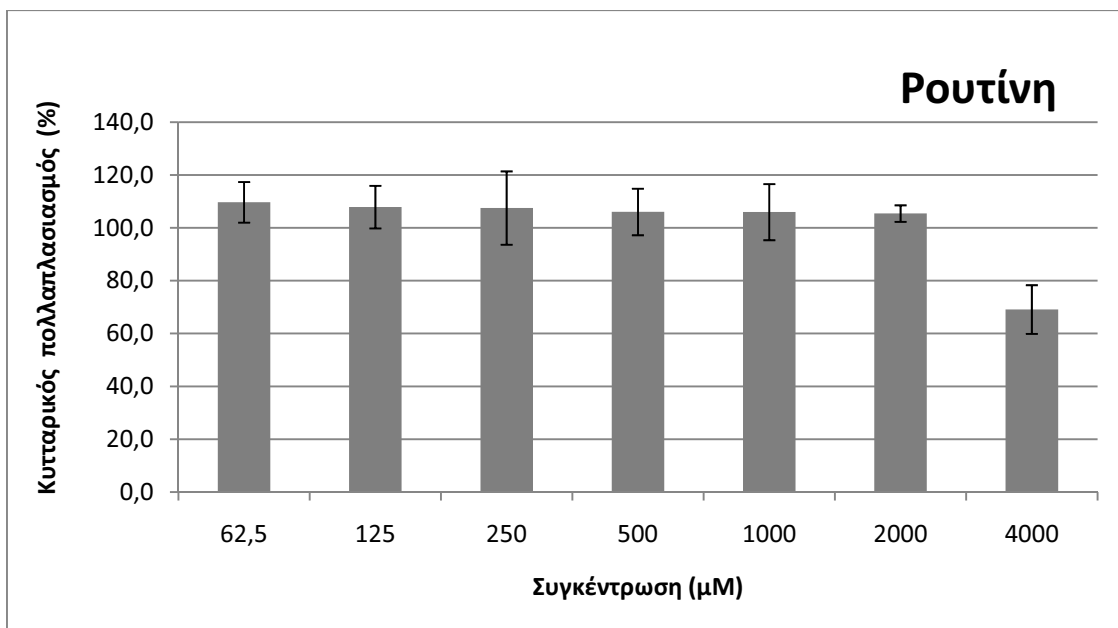
Γράφημα 21. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επιγαλοκατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 22. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουερσετίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

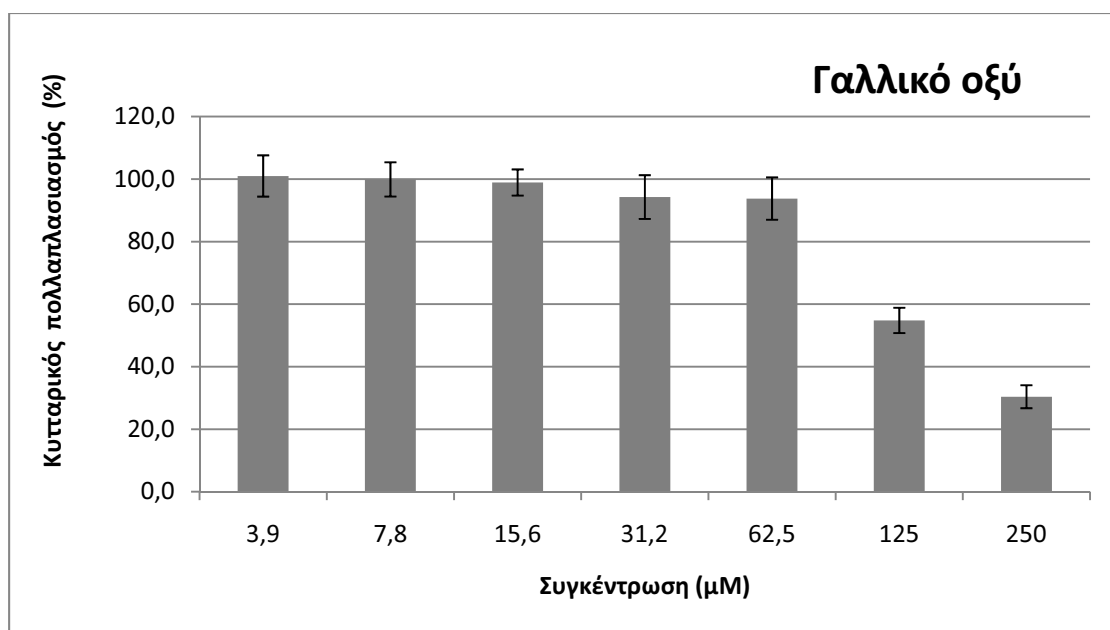


Γράφημα 23. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναρινγίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

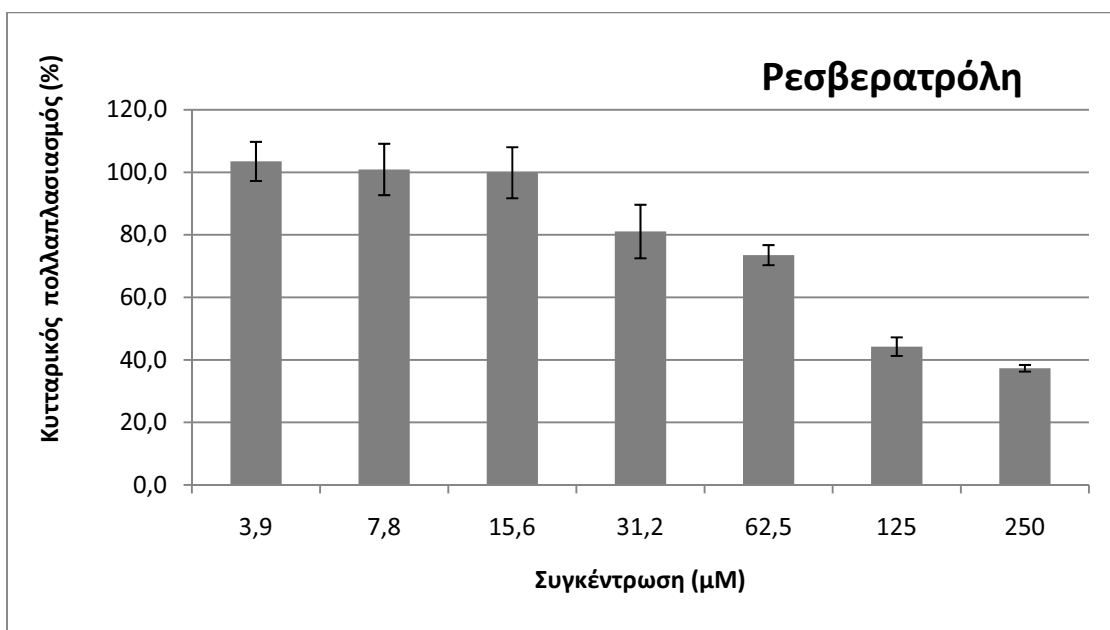


Γράφημα 24. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρουτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

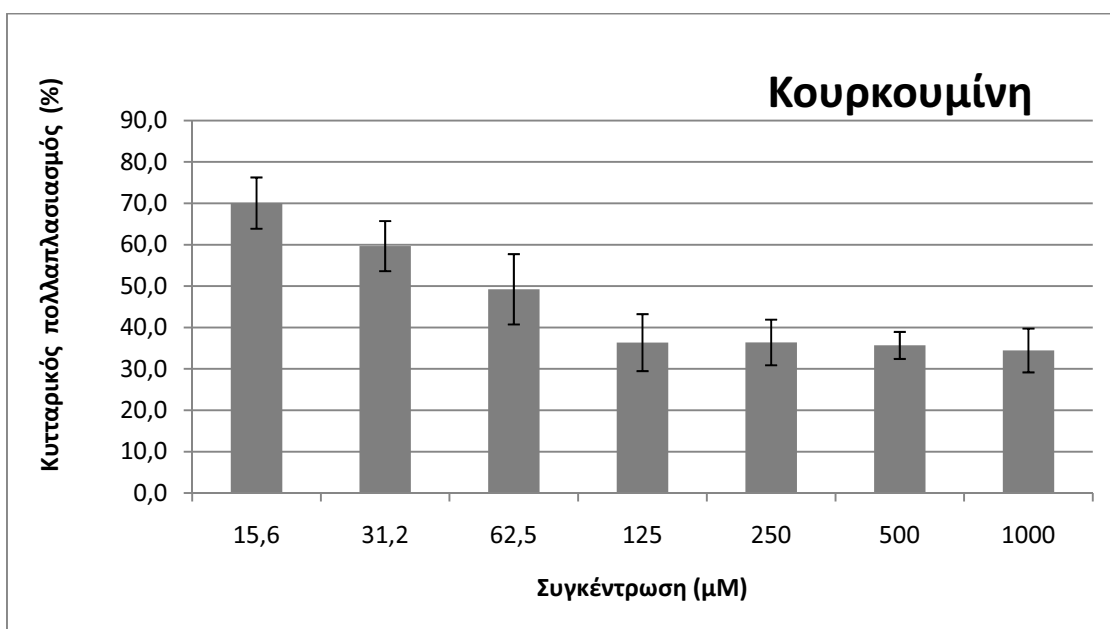
Όσον αφορά τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά, η χορήγηση γαλλικού οξέος στα MRC-5 κύτταρα (γράφημα 25) έφερε επιβίωση των MRC-5 κυττάρων στο 30% στην μεγαλύτερη της συγκέντρωση (250μM). Στην ίδια συγκέντρωση, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές είχαν επιβίωση περίπου 15%. Η ρεσβερατρόλη στα MRC-5 κύτταρα (Γράφημα 26) οδήγησε σε επιβίωση των MRC-5 κυττάρων στο 40% στη μεγαλύτερη της συγκέντρωση των 250μM. Στην ίδια συγκέντρωση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές είχαμε επιβίωση γύρω στο 20%. Η κουρκουμίνη στα MRC-5 κύτταρα (γράφημα 27) οδήγησε σε επιβίωση των MRC-5 κυττάρων στο 35% στη μεγαλύτερη της συγκέντρωση 1000μM. Στην ίδια συγκέντρωση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές η επιβίωση υπολογίστηκε περίπου στο 15%. Η κουρκουμίνη ενώ είναι τοξική στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (IC_{50} LMS 27,3±5.5, IC_{50} H1299 26±4) σε αυτές τις συγκεντρώσεις του IC_{50} η επιβίωση των MRC-5 κυττάρων είναι 100%.



Γράφημα 25. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.



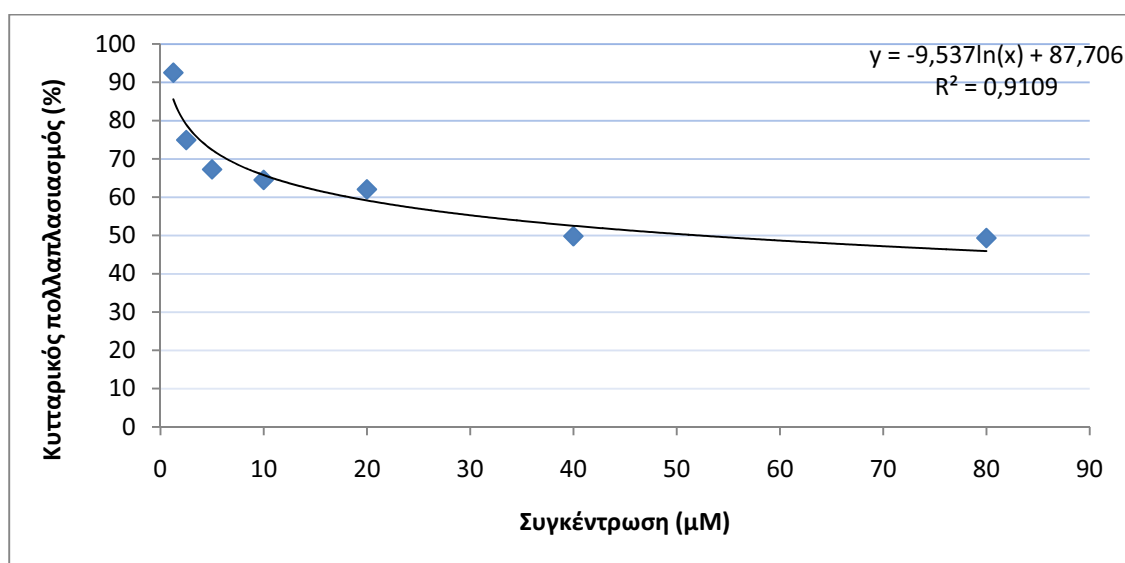
Γράφημα 26. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 27. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στην φυσιολογική κυτταρική σειρά (MRC-5) συμπεραίνεται ότι για να επέλθει τοξικότητα στα κύτταρα αυτά χρειάζονται μεγάλες δόσεις φυτοχημικών ουσιών. Η ουσίες αυτές είναι τοξικές για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές και όχι στην φυσιολογική κυτταρική σειρά.

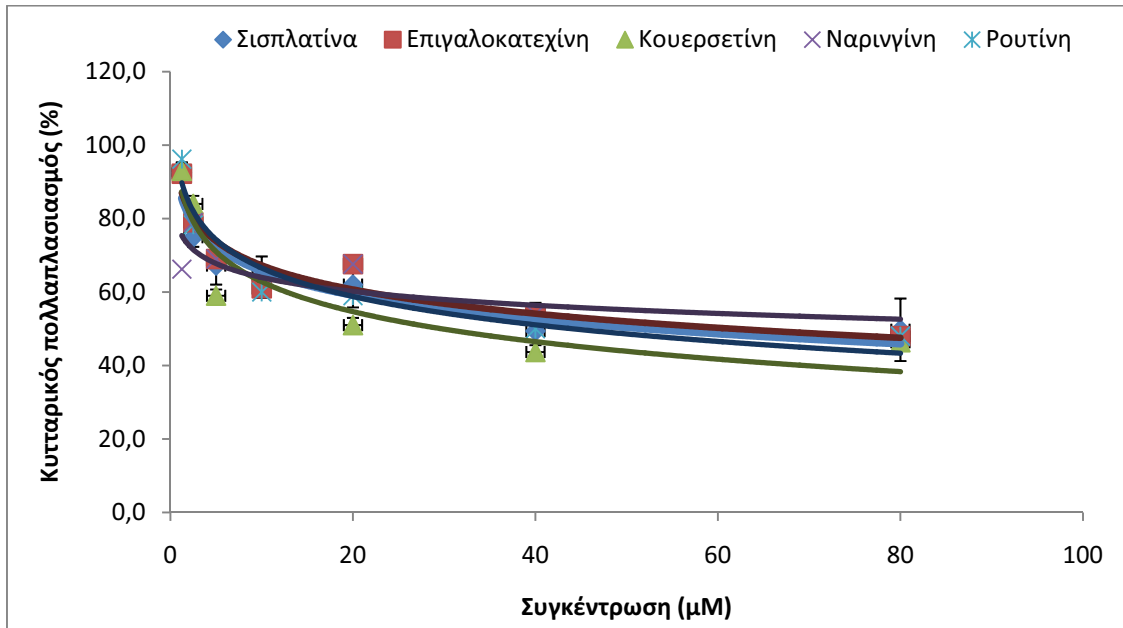
Στο γράφημα 28 παρουσιάζεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός MRS-5 κυττάρων (φυσιολογικών ινοβλαστών) μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων σισπλατίνης.



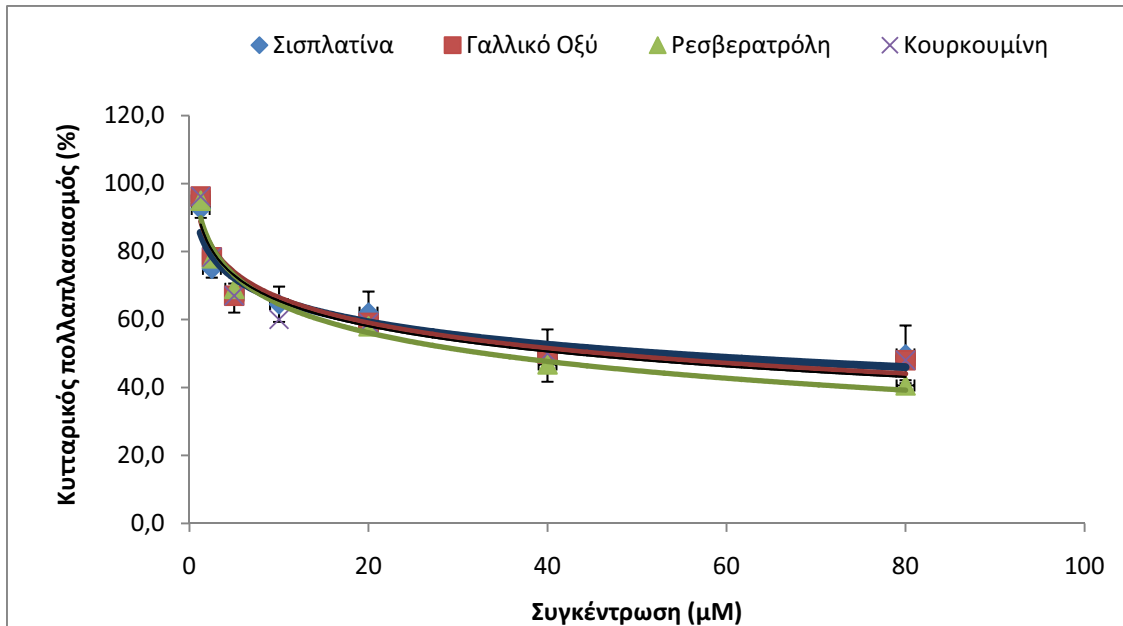
Γράφημα 28. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός MRS-5 κυττάρων μετά από χορήγηση σισπλατίνης σε συγκεντρώσεις από 1,25-80μΜ.

Μετά από χορήγηση σισπλατίνης στα MRC-5 κύτταρα η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης υπολογίζεται στη συγκέντρωση 48±3.1μΜ.

Στα παρακάτω γραφήματα (γράφημα 29 και γράφημα 30) απεικονίζεται η προεπάση των MRC- κυττάρων με τα φυτοχημικά και μετά πραγματοποιήθηκε προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1.25-80μΜ. Συγκεκριμένα έγινε προεπάση με 30μΜ επιγαλοκατεχίνης, κουερσετίνης, ναρινγίνης και ρουτίνης. Για τις ουσίες γαλλικό οξύ και ρεσβερατρόλη πραγματοποιήθηκε προεπάση με 15μΜ ουσίας ενώ για την κουρκουμίνη έγινε προεπάση με 7.5 μΜ ουσίας.



Γράφημα 29. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς MRC-5 μετά από προεπίσπαση με τα φλαβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη, ναρινγίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

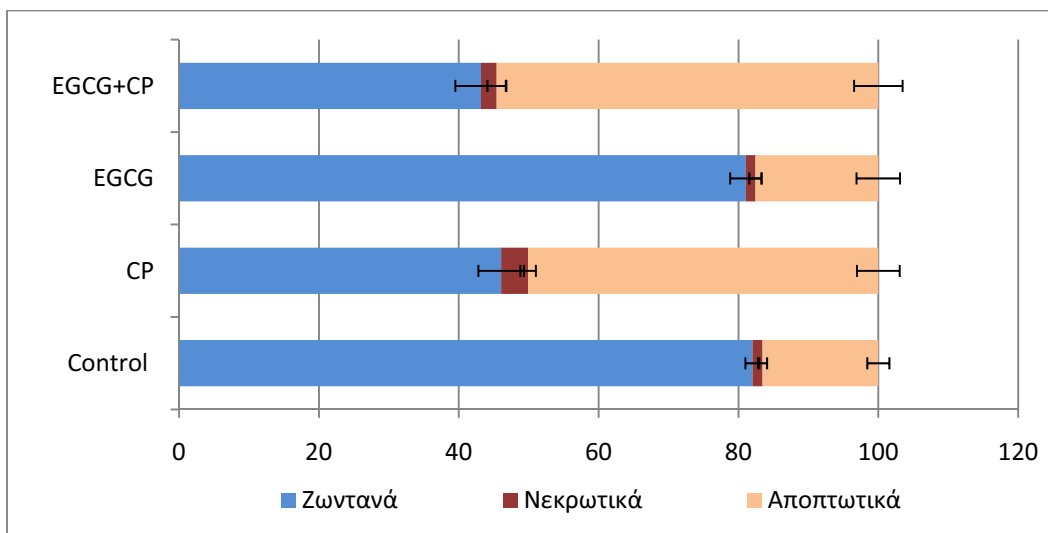


Γράφημα 30. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς MRC-5 μετά από προεπίσπαση με τα μη φλαβονοειδή φυτοχημικά γαλλικό οξύ, ρεσβερατρόλη, κουρκουμίνη και έπειτα προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας παρατηρείται ότι όταν προεπώζουμε την MRC-5 κυτταρική σειρά με τα φυτοχημικά και στη συνέχεια προσθέτουμε σισπλατίνη, δεν παρατηρείται επιπλέον τοξικότητα στη δράση της σισπλατίνης. Αυτό είναι ένα θετικό αποτέλεσμα γιατί προεπώζοντας τα κύτταρα με τα φυτοχημικά παρατηρείται αύξηση στην τοξικότητα της σισπλατίνης μόνο για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές.

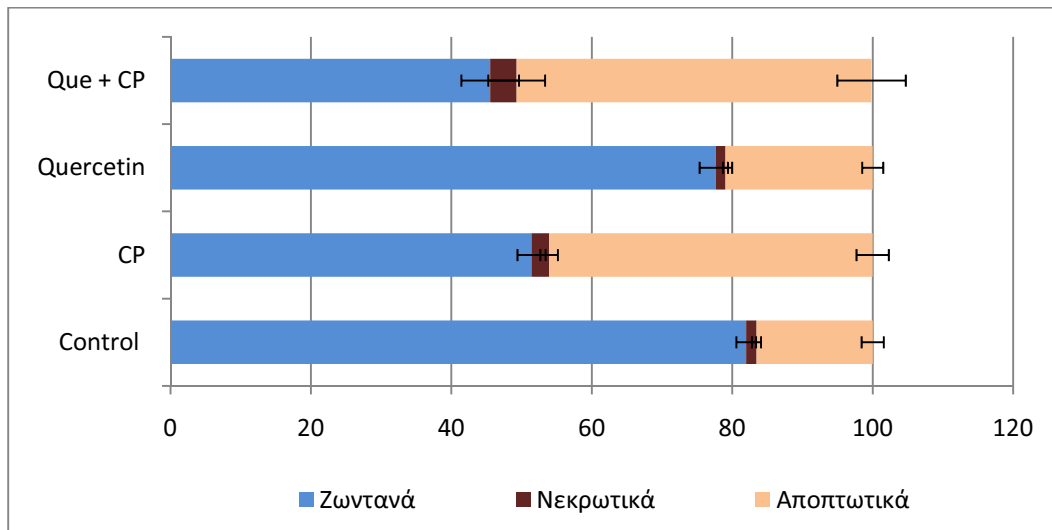
3.1.5 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής (απόπτωση- νέκρωση)

Για τον προσδιορισμό των αρχικών σταδίων της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής.



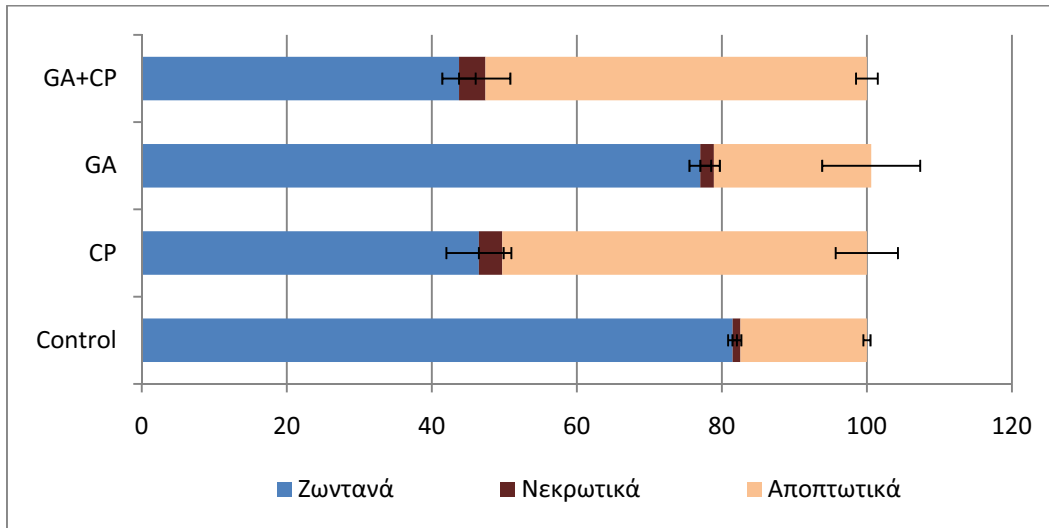
Γράφημα 31. Κυτταρομέτρία ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση με επιγαλοκατεχίνη (30μM), σισπλατίνη και του συνδυασμού σισπλατίνης και επιγαλοκατεχίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων \pm τ.α..

Στο γράφημα 31 κυτταρομετρίας ροής απεικονίζεται η δράση της επιγαλοκατεχίνης, της σισπλατίνης και του συνδυασμού τους στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώαση, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι 82%, των νεκρωτικών 1.6% και των αποπτωτικών είναι 16.55%. Στη συγκέντρωση IC₅₀ της σισπλατίνης το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται στο 46.06 %, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 50.08%. Παρατηρείται επαγωγή της απόπτωσης από την σισπλατίνη. Επίσης, στην περίπτωση όπου στα κύτταρα έγινε προεπώαση με την επιγαλοκατεχίνη παρατηρούμε μια επιπλέον αύξηση στο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στο 54.57% ($p < 0.05$) συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της. Στην περίπτωση χορήγησης επιγαλοκατεχίνης στην συγκέντρωση των 30μM (συγκέντρωση προεπώασης) δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική αλλαγή συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις.



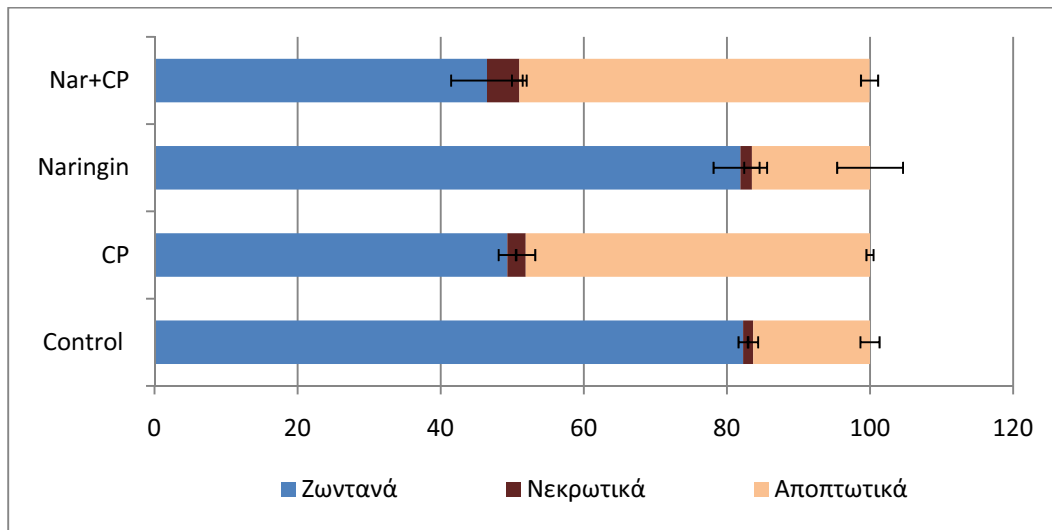
Γράφημα 32. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση με κουερσετίνη, σισπλατίνη και του συνδυασμού σισπλατίνης και κουερσετίνης . Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων \pm τ.α.

Στο γράφημα 32 κυτταρομετρίας ροής απεικονίζεται η δράση της κουερσετίνης, της σισπλατίνης και του συνδυασμού τους στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώαση το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι 82%, των νεκρωτικών 1.46% και των αποπτωτικών είναι 16.55%. Στη συγκέντρωση IC_{50} της σισπλατίνης το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται στο 51.41 %, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 46.08%. Επίσης, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση όπου έγινε προεπώαση των κυττάρων με την κουερσετίνη το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο ποσοστό 54.54% ($p < 0.05$) συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της. Στην περίπτωση χορήγησης κουερσετίνης στην συγκέντρωση των 30 μ M (συγκέντρωση προεπώασης) δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική αλλαγή συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις.



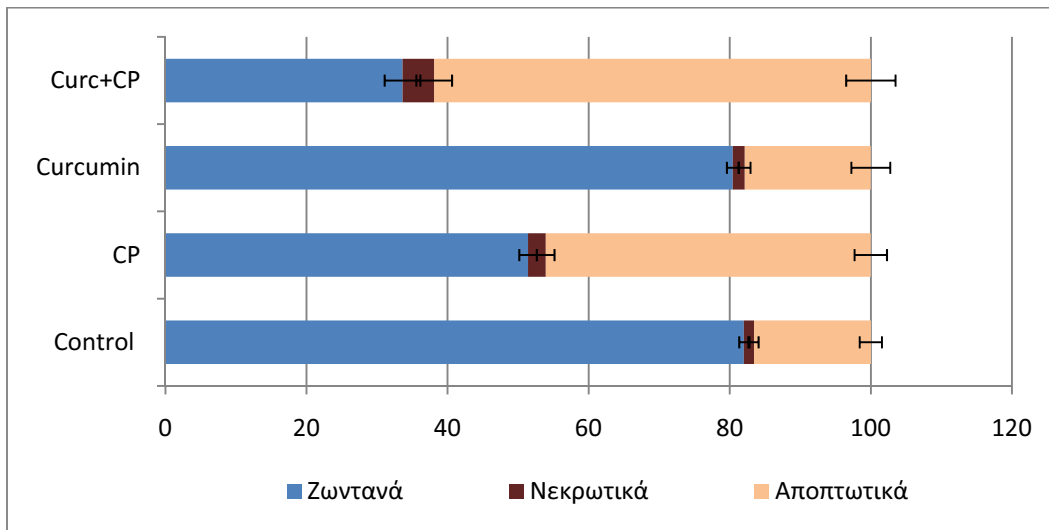
Γράφημα 33. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση των κυττάρων με γαλλικό οξύ, σισπλατίνη, και του συνδυασμού γαλλικού οξέως και σισπλατίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων \pm τ.α

Στο γράφημα 33 κυτταρομετρίας ροής απεικονίζεται η δράση του γαλλικού οξέος, της σισπλατίνης και του συνδυασμού τους στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώαση, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι 81.47%, των νεκρωτικών 1.09% και των αποπτωτικών είναι 17.44%. Στη συγκέντρωση IC_{50} της σισπλατίνης το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται στο 46.49 %, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 52.6%. Επίσης, στην περίπτωση που τα LMS κύτταρα υπέστησαν προεπώαση με το γαλλικό οξύ παρατηρούμε μια επιπλέον αύξηση στο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στο ποσοστό 52.6% ($p < 0.05$) συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της. Στην περίπτωση χορήγησης γαλλικού οξέως στην συγκέντρωση των 15 μ M (συγκέντρωση προεπώασης) δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική αλλαγή συγκριτικά με τα κύτταρα control. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις.



Γράφημα 34. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά από επώαση με ναρινγίνη, σισπλατίνη και του συνδυασμού ναρινγίνης και σισπλατίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων \pm τ.α.

Στο γράφημα 34 κυτταρομετρίας ροής απεικονίζεται η δράση της ναρινγίνης, της σισπλατίνης και του συνδυασμού τους στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώαση, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι 82.27%, των νεκρωτικών 1.40% και των αποπτωτικών είναι 16.55%. Στη συγκέντρωση IC_{50} της σισπλατίνης το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται στο 49.30 %, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 48.10%. Επίσης, παρατηρούμε ότι στην προεπώαση των κυττάρων με την ναρινγίνη δεν παρατηρούμε κάποια επιπλέον αύξηση στο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων 48.94%. Στην περίπτωση χορήγησης της ναρινγίνης στην συγκέντρωση των 15 μ M (συγκέντρωση προεπώασης) δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική αλλαγή συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις.



Γράφημα 35. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την επώαση με κουρκουμίνη, σισπλατίνη και του συνδυασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων \pm τ.α

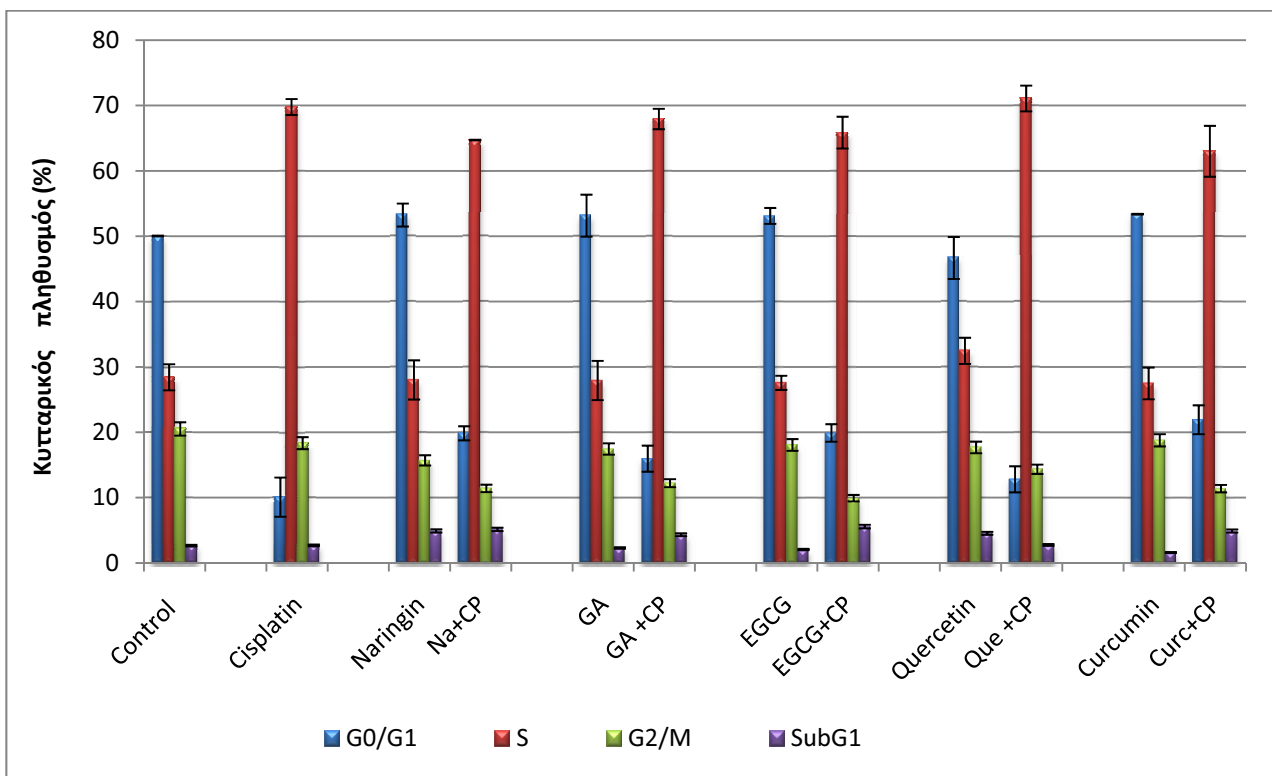
Στο γράφημα 35 κυτταρομετρίας ροής απεικονίζεται η δράση της κουρκουμίνης, της σισπλατίνης και του συνδυασμού τους στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώαση, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι 82.27%, των νεκρωτικών 1.40% και των αποπτωτικών είναι 16.31%. Στη συγκέντρωση IC50 της σισπλατίνης το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται στο 49.30 %, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 46.08%. Επίσης, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση όπου τα κύτταρα υπέστησαν προεπώαση με την κουρκουμίνη υπάρχει αύξηση στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο 61.89% ($p < 0.05$) συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της. Στην περίπτωση χορήγησης της κουρκουμίνης στην συγκέντρωση των 7.5 μ M (συγκέντρωση προεπώασης) δεν παρατηρούμε κάποια σημαντική αλλαγή συγκριτικά με τα κύτταρα control. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, παρατηρείται πως ο τρόπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά τη χορήγηση σισπλατίνης είναι αποπτωτικός. Επίσης, παρατηρείται ότι προεπώαση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, γαλλικό οξύ και κουρκουμίνη, αύξησε επιπλέον την απόπτωση των κυττάρων, συγκριτικά με τη

σισπλατίνη (μόνη της). Η προεπώαση με ναρινγίνη δεν έφερε κάποια αλλαγή στην απόπτωση, συγκριτικά με αυτή, που μετρήθηκε μετά από τη χορήγηση μόνο της σισπλατίνης. Η κουρκουμίνη ήταν η ουσία, που κατόπιν προεπώασης των LMS κυττάρων με αυτή, προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση στην απόπτωση, συγκριτικά με την απόπτωση, που προκαλεί η χορήγηση της σισπλατίνης από μόνης της και συγκεκριμένα σε ποσοστό 16%.

3.1.6 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Τα παρακάτω αποτελέσματα έχουν να κάνουν με την ανάλυση διάφορων φάσεων του κυτταρικού κύκλου μετά από χορήγηση φυτοχημικών, της σισπλατίνης και του συνδυασμού φυτοχημικών και σισπλατίνης .



Γράφημα 36. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων παρουσία φυτοχημικών, σισπλατίνης και του συνδυασμού φυτοχημικών και σισπλατίνης.

	G0/G1	S	G2/M
Control	50.05%± 2	28.42%±1.2	20.52%±1.79
Cisplatin	10.08%±1.97	69.78%±2.1	18.34%±0.21
Naringin	53.25%±1.34	28.02%±0.15	15.71%±0.86
Na+CP	19.85%±3	64.73%±1.56	11.42%±1.37
GA	53.16%±0.05	27.93%±1.13	17.45%±1.18
GA +CP	15.97%±2.21	67.94%±0.24	12.22%±1.19
EGCG	53.11%±1.56	27.57%±0.61	18.07%±0.75
EGCG+CP	19.91%±3.47	65.86%±1.45	9.93%±0.87
Quercetin	46.68%±1.12	32.47%±3.14	17.69%±1.65
Que +CP	12.81%±2.45	65.05%±1.27	14.35%±1.43
Curcumin	53.38%±3.31	27.49%±1.81	18.78%±0.45
Curc+CP	21.93%±0.78	63%±1.12	11.38%±1.76

Πίνακας 7. Προσδιορισμός των ποσοστών του κυτταρικού πληθυσμού των LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

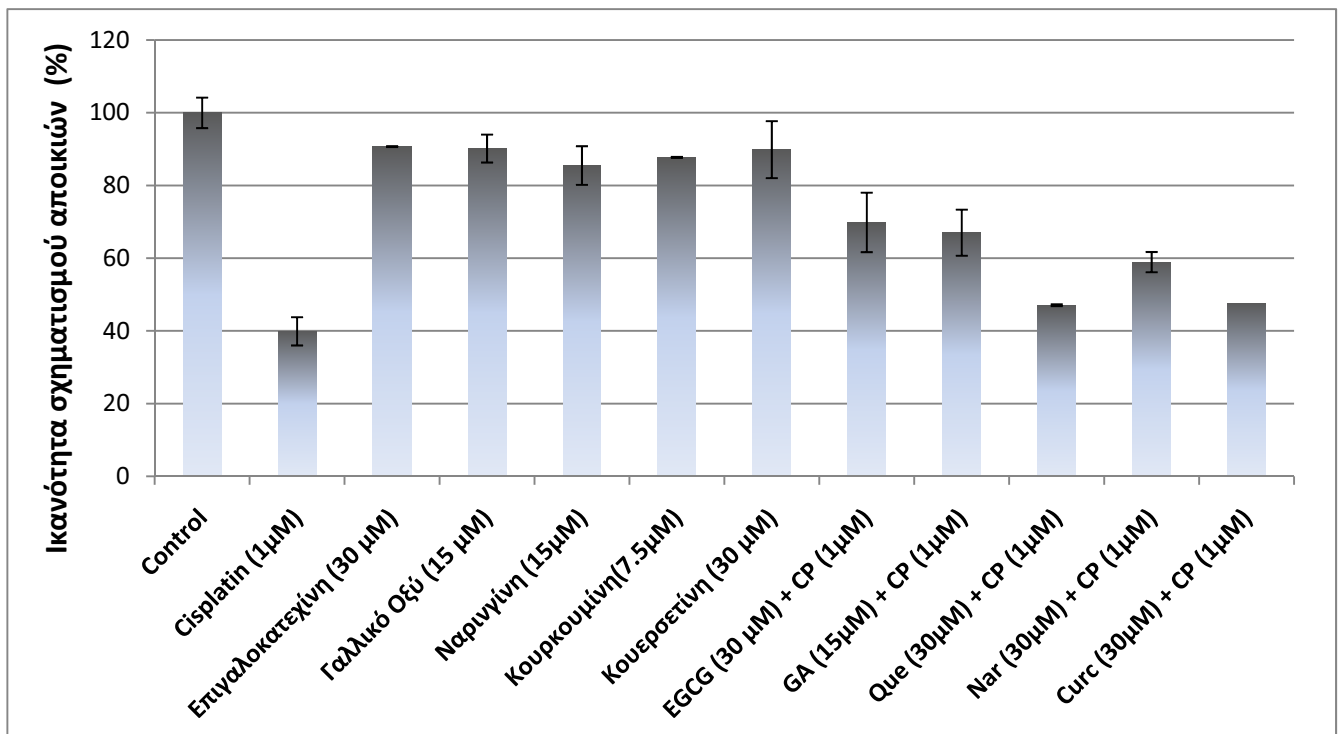
Στο γράφημα 36 και στον πίνακα 7 απεικονίζεται η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα LMS κύτταρα μετά από επίδραση της σισπλατίνης (8,6μM, τιμή IC₅₀), των φυτοχημικών και του συνδυασμού τους. Η αγωγή με σισπλατίνη, καθώς και ο συνδυασμός σισπλατίνης με φυτοχημικά, προκάλεσαν διαταραχές στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στα LMS κύτταρα. Τα κύτταρα control έδειξαν ότι το 50,05% των κυττάρων ήταν στην φάση ανάπτυξης (G0/G1), 28,42% στην φάση σύνθεσης του DNA (S) και 20.52% στη φάση διαίρεσης (G2/M) φάση. Η χορήγηση σισπλατίνης στην τιμή του IC₅₀ (8,6μM), έδειξε να αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων στην S φάση, σε 69.78%. Επομένως, η σισπλατίνη φαίνεται να επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση σύνθεσης του DNA (φάση S).

Μετά από προεπάσης των LMS κυττάρων με τις φυτοχημικές ουσίες και κατόπιν χορήγησης σισπλατίνης, παρατηρήθηκε μείωση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην S φάση. Πιο συγκεκριμένα η προεπάση με ναρινγίνη μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση σε 64.73% (p<0.05), συγκριτικά με αυτή, που παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση μόνο σισπλατίνης. Η προεπάση με το γαλλικό οξύ μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση στο 67.94% (p<0.05), συγκριτικά με τη σισπλατίνη (μόνη της). Η προεπάση με επιγαλοκατεχίνη μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση σε 65.86% (p<0.05). Η προεπάση με την

κουερσετίνη μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση στο 65.08% ($p < 0.05$) συγκριτικά με την σισπλατίνη. Η προεπάωση με κουρκουμίνη μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση στο 63% ($p < 0.05$), σχετικά με την σισπλατίνη (σε σχέση με αυτή, που εμφανίστηκε από τη χορήγηση σισπλατίνης). Η μεγαλύτερη μείωση στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, παρατηρείται μετά από προεπάωση των κυττάρων με κουρκουμίνη, όπου παρατηρείται περίπου 9.5% μείωση. Η χορήγηση Ναρινγίνης (30 μ M), Γαλλικού οξέος (15 μ M), Επιγαλοκατεχίνης (30 μ M), Κουερσετίνης (30 μ M) και Κουρκουμίνης (7.5 μ M) δεν φαίνεται να φέρει κάποια σημαντική αλλαγή στον κυτταρικό κύκλο, συγκριτικά με τις τιμές Control

Συνολικά, στην περίπτωση της προεπάωσης με τα φυτοχημικά, παρατηρείται ότι τα κύτταρα παραμένουν στην φάση ανάπτυξης (G0/G1), οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση.

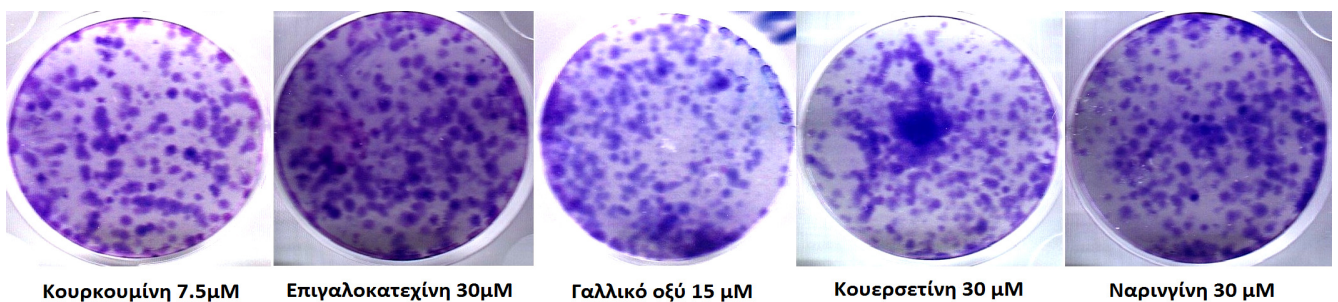
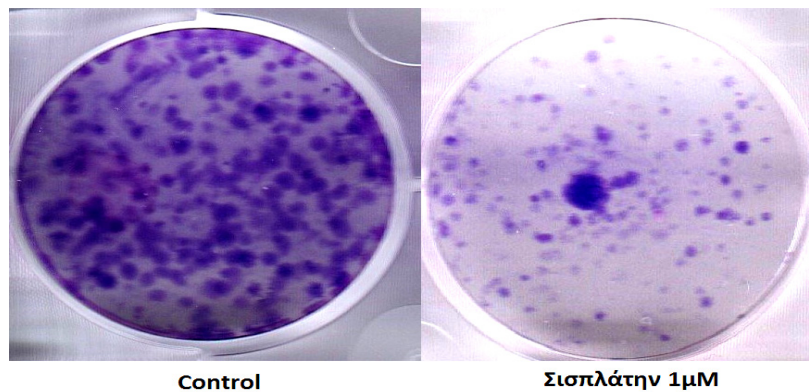
3.1.7 Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς

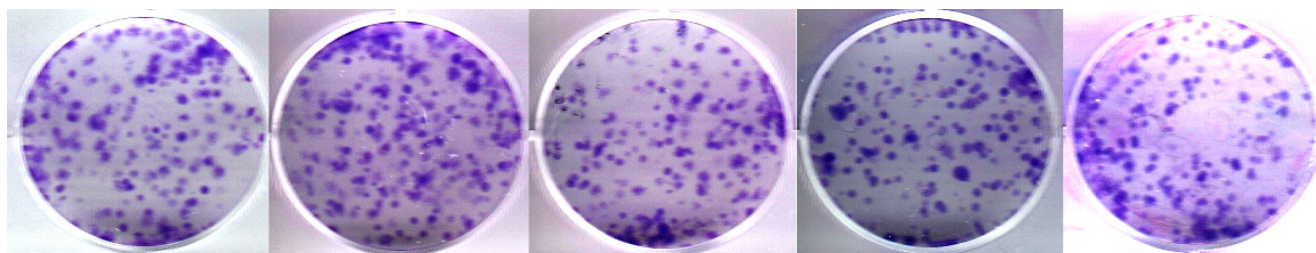


Γράφημα 37. Ποσοστό της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των LMS κυττάρων, παρουσία φυτοχημικών, σισπλατίνης και του συνδυασμού φυτοχημικών και σισπλατίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

Το γράφημα 37 αναπαριστά τον αριθμό αποικιών των LMS κυττάρων μετά από έκθεση στην σισπλατίνη, την επιγαλοκατεχίνη, το γαλλικό οξύ, την ναρινγίνη, της κουρκουμίνης, της κουερσετίνης, και του συνδυασμού σισπλατίνη και φυτοχημικών. Από τα αποτελέσματα μας παρατηρείται ότι μετά από έκθεση των κυττάρων σε μια πολύ μικρή συγκέντρωση σισπλατίνης, του 1 μ M, η ικανότητα ανάπτυξης αποικιών αγγίζει μόλις το 40%. Σε συγκεντρώσεις σισπλατίνης, μεγαλύτερες από 2.5 μ M, τα κύτταρα ήταν αδύνατον να δημιουργήσουν αποικίες. Όσον αφορά την έκθεση των κυττάρων στις φυτοχημικές ουσίες, τα ποσοστά ανάπτυξης αποικιών των κυττάρων εμφανίζονται να είναι πολύ κοντά στα αντίστοιχα ποσοστά των κυττάρων ελέγχου (control). Η προεπάση των κυττάρων με τα φυτοχημικά, αύξησε το ποσοστό ανάπτυξης αποικιών, μετά από προσθήκη σισπλατίνης. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τα προηγούμενα μας αποτελέσματα, και αυτό ίσως να εξηγείται λόγω της μικρής δόσης της σισπλατίνης, με την οποία επώαστηκαν τα LMS κύτταρα.

Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα τρυβλία όπου διακρίνεται ο σχηματισμός των αποικιών.





Κουρκουμίνη 7.5μM
Σισπλατίνη 1μM

Επιγαλοκατεχίνη 30μM
Σισπλατίνη 1μM

Γαλλικό οξύ 15μM
Σισπλατίνη 1μM

Κουερσετίνη 30μM
Σισπλατίνη 1μM

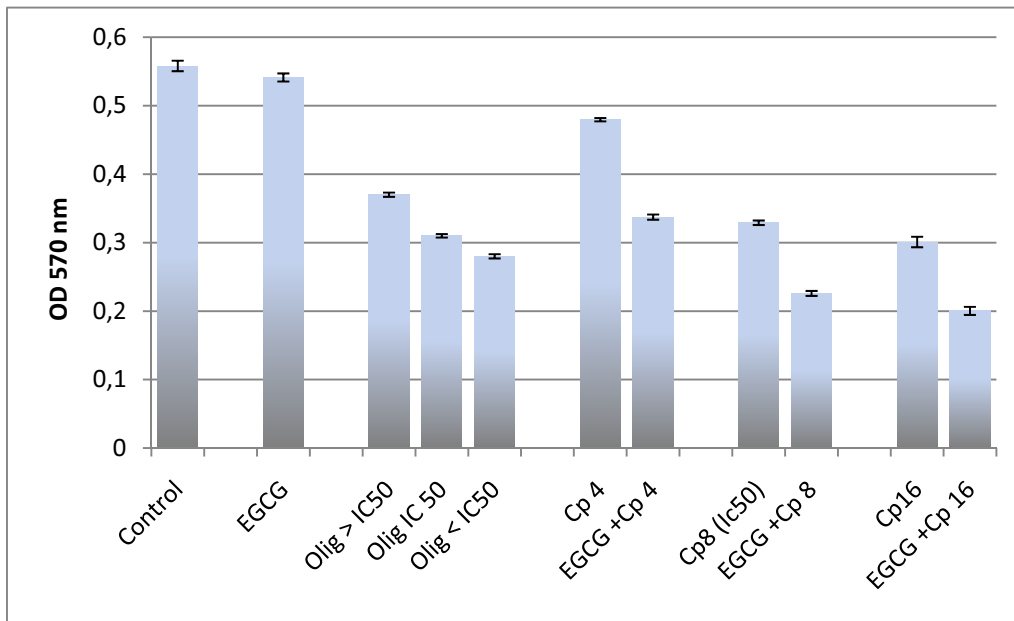
Ναρινγίνη 30μM
Σισπλατίνη 1μM

Εικόνα 25. Εικόνα από τα τρυβλία όπου διακρίνεται ο σχηματισμός των αποικιών.

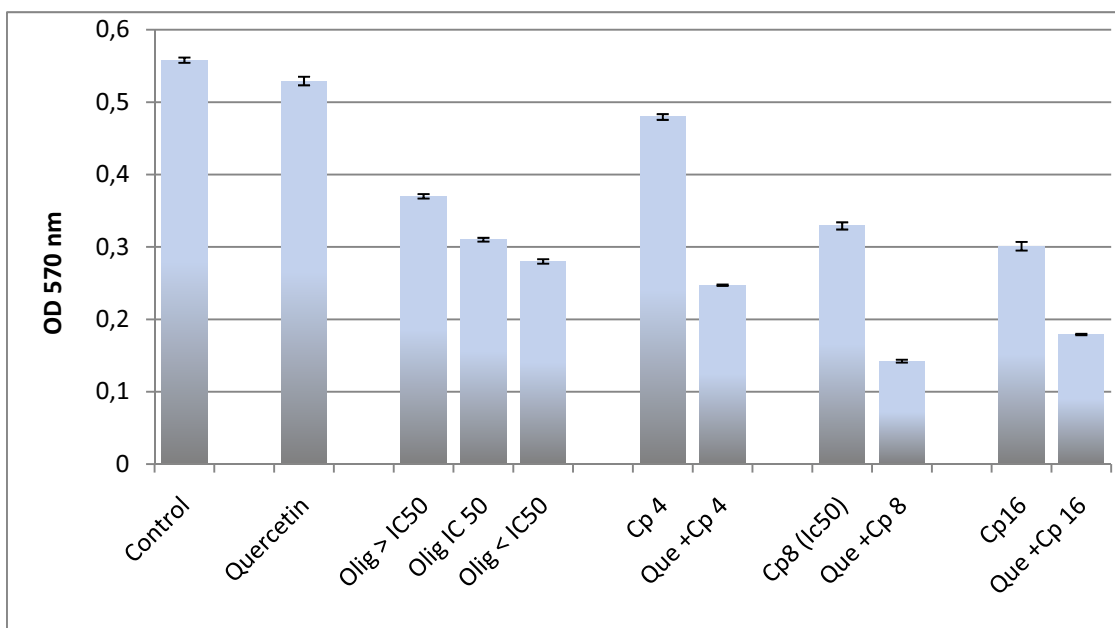
3.1.8 Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης

Μετά την επώαση για 24 ώρες της LMS κυτταρικής σειράς με τα φυτοχημικά, με την σισπλατίνη και τον συνδυασμό φυτοχημικών και σισπλατίνη μετρήθηκε η αναστολή των οξειοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων. Η σισπλατίνη προστέθηκε σε συγκεντρώσεις ίσες και μεγαλύτερες από την τιμή IC₅₀ της ενώ για τα φυτοχημικά προστέθηκε η συγκέντρωση επώασης. Επίσης στα κύτταρα προστέθηκε και ένας αναστολέας τον μιτοχονδρίων, η ολιγομικίνη, ως ουσία ελέγχου.

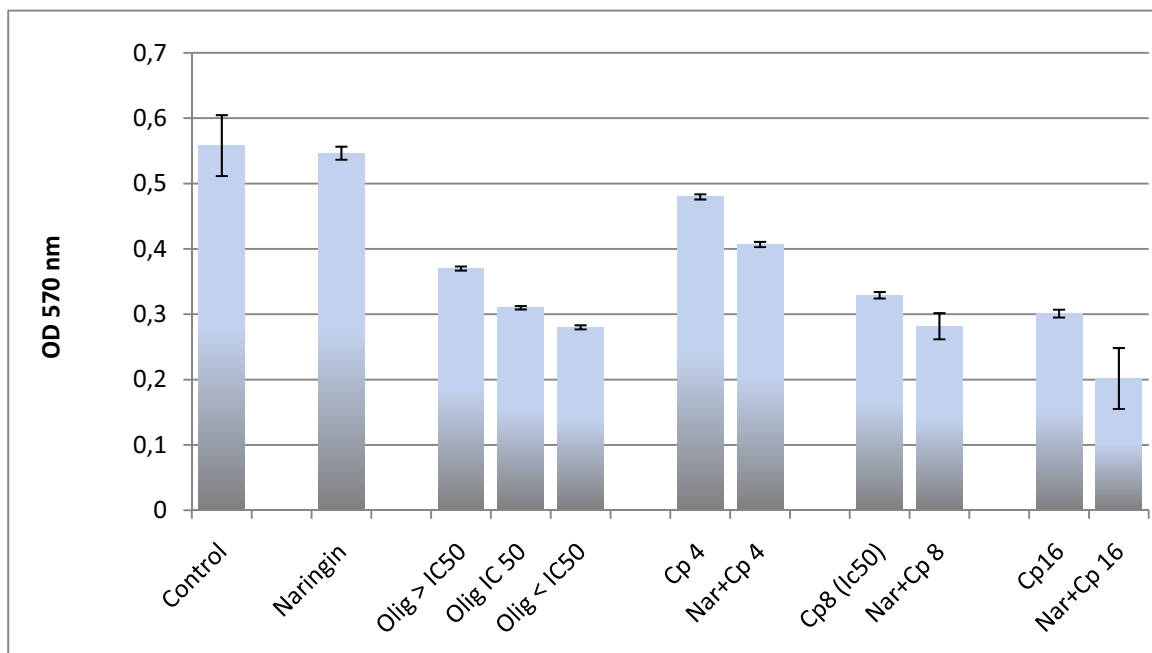
Στα γραφήματα 38, 39, 40 απεικονίζεται η αναστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων μετά από επώαση των LMS κυττάρων με τα флаβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη και ναρινγίνη στην συγκέντρωση προεπώασης, δηλαδή 30μM. Επίσης, τα κύτταρα επώαστηκαν με τρεις συγκεντρώσεις σισπλατίνης και συγκεκριμένα με την συγκέντρωση της τιμής IC₅₀, με μία συγκέντρωση μικρότερη από το IC₅₀ και με μια συγκέντρωση μεγαλύτερη του IC₅₀. Όπως παρατηρούμε, η επιγαλοκατεχίνη, η κουερσετίνη και η ναρινγίνη, στη συγκέντρωση της προεπώασης, δεν έχουν κάποια διαφορά από την τιμή του control, επομένως δεν φέρουν κάποια αναστολή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Όσον αφορά τη σισπλατίνη, παρατηρείται ότι αυτή προκαλεί αναστολή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της σισπλατίνης. Ο συνδυασμός флаβονοειδών και σισπλατίνης ενισχύει τη δράση της σισπλατίνης και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κατά την προεπώαση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη και κουερσετίνη, παρατηρείται μεγαλύτερη ενίσχυση στη δράση της σισπλατίνης, ενώ η προεπώαση των κυττάρων με ναρινγίνη επιφέρει μικρότερη αύξηση στη δράση της σισπλατίνης, από τα флаβονοειδή φυτοχημικά.



Γράφημα 38: Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη (30μM), σισπλατίνη, επιγαλοκατεχίνη και σισπλατίνη, καθώς και ολιγομυκίνη.



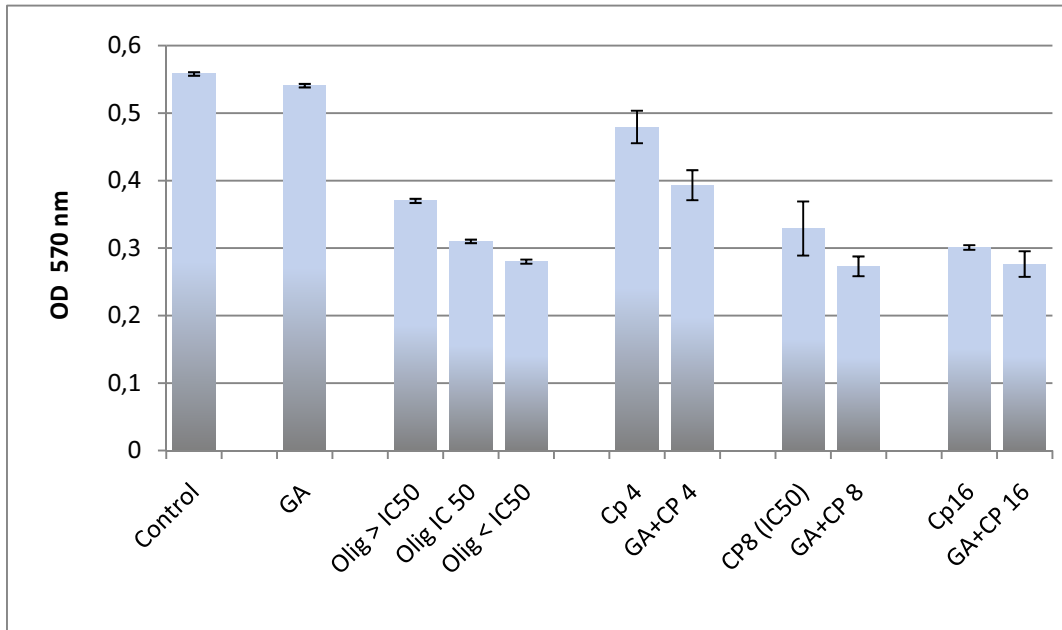
Γράφημα 39: Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των LMS κυττάρων με κουερσετίνη (30μM), σισπλατίνη, κουερσετίνη και σισπλατίνη, καθώς και ολιγομυκίνη.



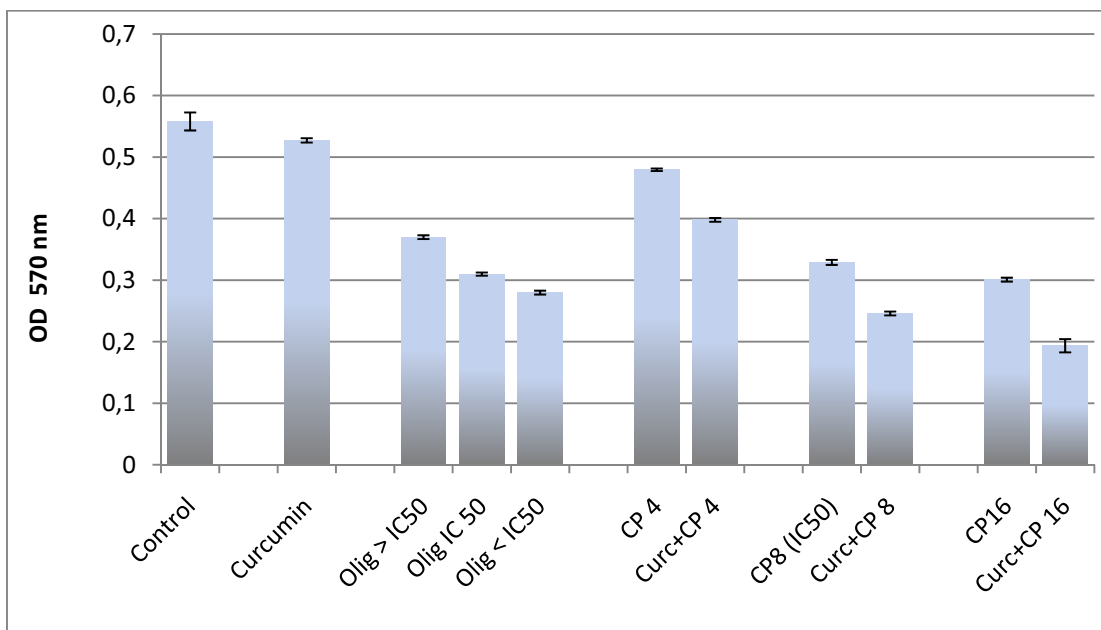
Γράφημα 40: Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των LMS κυττάρων με ναρινγίνη (30 μ M), σισπλατίνη, ναρινγίνη και σισπλατίνη, καθώς και ολιγομυκίνης

Στο γράφημα 41 και 42 απεικονίζεται η αναστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων μετά από επώαση των LMS με το γαλλικό οξύ και την κουρκουμίνη στην συγκέντρωση προεπώασης δηλαδή 15 μ M και 7.5 μ M αντίστοιχα. Επίσης τα κύτταρα επώαστηκαν με τρεις συγκεντρώσεις σισπλατίνης και συγκεκριμένα με την τιμή IC₅₀, με μία τιμή μικρότερη από το IC₅₀ και με μια τιμή μεγαλύτερη του IC₅₀. Όπως παρατηρούμε το γαλλικό οξύ και η κουρκουμίνη στην συγκέντρωση της προεπώασης δεν έχουν κάποια διαφορά από την τιμή του control, δεν φέρουν κάποια αναστολή στην λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Όσο αφορά την σισπλατίνη παρατηρούμε ότι προκαλεί αναστολή στην λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία αναστολή αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της σισπλατίνης. Η προεπώαση των κυττάρων με το γαλλικό οξύ και με την κουρκουμίνη ενισχύουν την δράση της σισπλατίνης και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Γράφημα 41: Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των LMS κυττάρων με γαλλικό οξύ (15μM), σισπλατίνη, γαλλικό οξύ και σισπλατίνης, καθώς και ολιγομυκίνης



Γράφημα 42: Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των LMS κυττάρων με κourkouμίνη (30μM), σισπλατίνη, κourkouμίνης και σισπλατίνης, καθώς και ολιγομυκίνης

Μετά την μελέτη της αναστολής των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων συμπεραίνεται ότι πιθανόν η σισπλατίνη προκαλεί αναστολή των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων. Η φυτοχημικές ουσίες στην συγκέντρωση επώασης δεν προκαλούν κάποια βλάβη στα μιτοχόνδρια. Η προεπώαση των LMS κυττάρων με τις φυτοχημικές ουσίες ενισχύουν την δράση της σισπλατίνης πράγμα το οποίο επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα από την μέθοδο του MTT και της κυτταρομετρίας ροής.

Συμπερασματικά, από όλα τα in vitro πειράματα παρατηρήθηκε ότι η δράση της σισπλατίνης ενισχύεται στα καρκινικά κύτταρα μετά από προεπώαση τους με συγκεκριμένες φυτοχημικές ενώσεις, ανάμεσα στις οποίες η κουρκουμίνη επέδειξε τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα

3.2 In vivo Αποτελέσματα

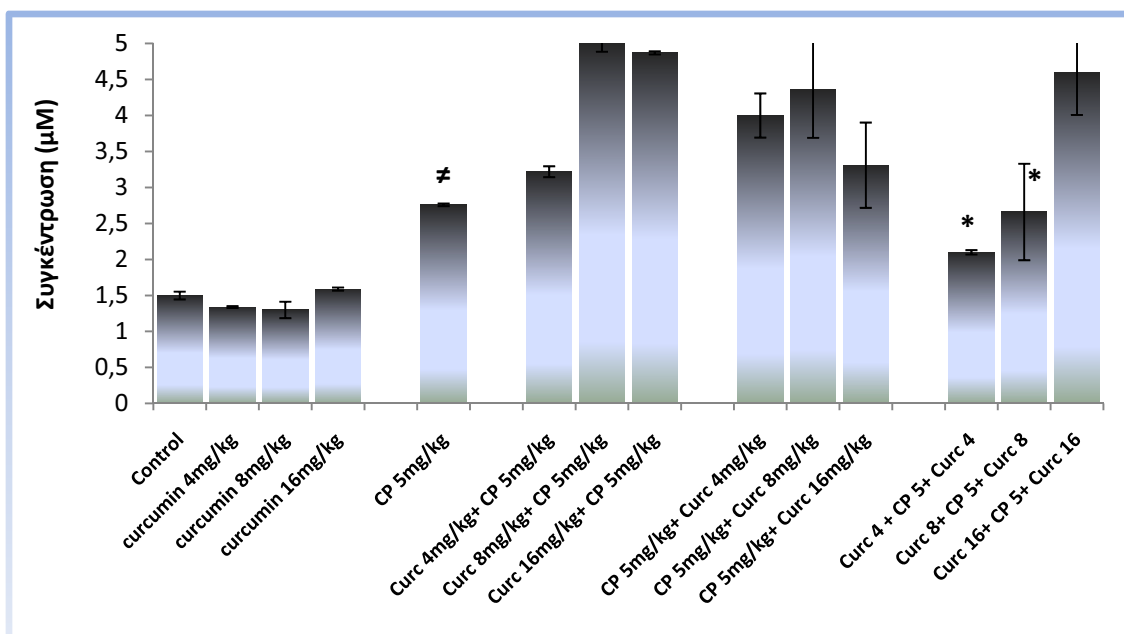
3.2.1 Μέτρηση επιπέδων μαλονικής διαλδεΐδης (MDA)

Μετά την διάρκεια του πειράματος και την συλλογή ούρων από κάθε ομάδα πειραματοζώων μετρήθηκαν τα επίπεδα μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) στα ούρα. Στο γράφημα 43 αποικονίζονται τα επίπεδα της MDA στην ομάδα control, στην ομάδα σισπλατίνης με δόση 5 mg/kg, την ομάδα όπου χορηγήθηκε μόνο κουρκουμίνη (4mg/kg, 8mg/kg, 16mg/kg), την ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη και μετά σισπλατίνη, στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα σισπλατίνη και μετά κουρκουμίνη, και στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη, έπειτα σισπλατίνη, και πάλι μετά κουρκουμίνη. Όπως παρατηρούμε και από το γράφημα η κουρκουμίνη στην δόση των 4 mg/kg και 8 mg/kg, μειώνει το MDA τις ομάδες ελέγχου. Στην ομάδα κουρκουμίνης 16 mg/kg παρατηρείται αύξηση της MDA, ίσως η δόση αυτή να είναι πολύ μεγάλη.

Παρατηρείται ότι η σισπλατίνη έστω και σε μικρή δόση 5 mg/kg αυξάνει τα επίπεδα της MDA σχεδόν στο διπλάσιο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.005$). Στις περιπτώσεις όπου γίνεται χορήγηση κουρκουμίνης πρώτα και μετά σισπλατίνης, και σισπλατίνης και κουρκουμίνης παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα MDA. Ίσως η βλάβη που έχει προκαλέσει η σισπλατίνη δεν μπορεί να είναι αναστρέψιμη σε καμία από τις δυο ομάδες.

Στην περίπτωση όμως όπου έχουμε χορήγηση της κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης στις δόσεις 4 mg/kg και 8 mg/kg παρατηρούμε μείωση στα επίπεδα της MDA σε σχέση με την σισπλατίνη μόνη της ($p < 0.05$ και στις δυο περιπτώσεις).

Η χορήγηση κουρκουμίνης στις δόσεις 4 mg/kg και 8 mg/kg πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης αποδείχτηκαν να είναι πιο αποτελεσματικές και φέρουν μείωση στα αυξημένα επίπεδα μηλονικής διαλδεύδης (MDA) που προκαλούνται από σισπλατίνη.



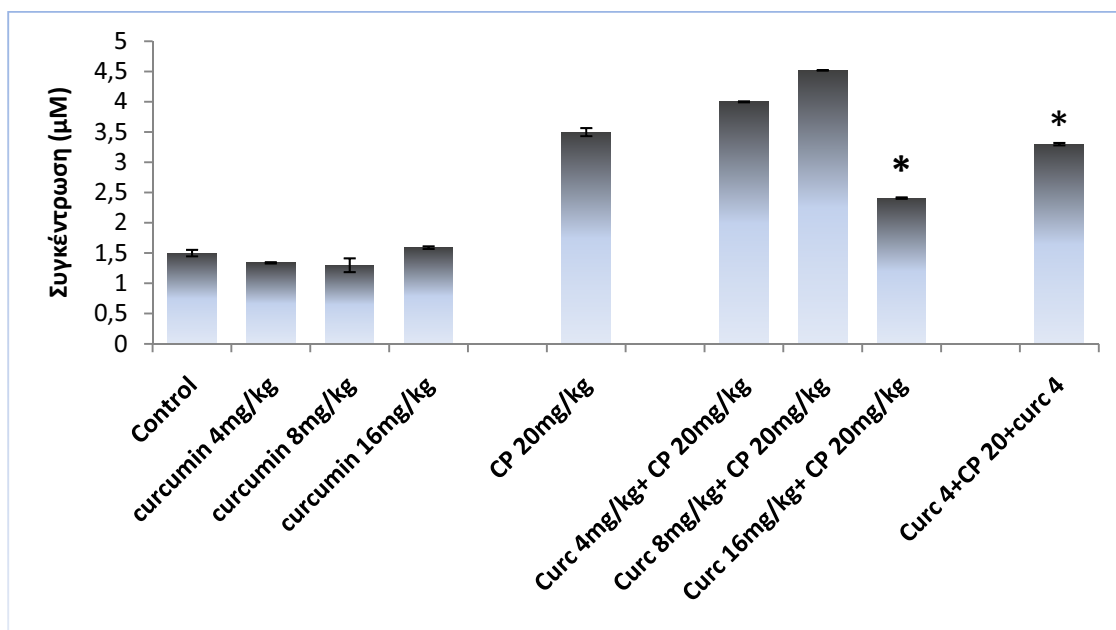
Γράφημα 43. Συγκέντρωση MDA στα ούρα. Τα επίπεδα της MDA μετρήθηκαν με τη χρήση φωτομετρικής μεθόδου του προϊόντος που παράγεται με τη χρήση αντιδραστηρίου TBA. #Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα ελέγχου, $p < 0.005$. *Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνης, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο γράφημα 44 απεικονίζονται τα επίπεδα MDA στην ομάδα control, στην ομάδα σισπλατίνης με δόση 20 mg/kg, στην ομάδα όπου χορηγήθηκε μόνο κουρκουμίνη (4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg), στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη και

μετά σισπλατίνη. Η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε πρώτα σισπλατίνη και μετά κουρκουμίνη απεβίωσε μετά την χορήγηση σισπλατίνης, επίσης και οι ομάδες όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη (8 mg/kg, 16 mg/kg), μετά σισπλατίνη 20 mg/kg, και πάλι μετά κουρκουμίνη (8 mg/kg, 16 mg/kg) .

Στην ομάδα κουρκουμίνης 16 mg/kg + CP 20 mg/kg παρατηρείται μείωση της MDA, η οποία είναι σημαντικά διαφορετικό συγκριτικά με την ομάδα σισπλατίνης 20 mg/kg ($p < 0.05$). Στην ομάδα κουρκουμίνης 4mg/kg + CP 20 mg/kg + curc 4 mg/kg ήταν η μόνη ομάδα που επιβίωσε μετά την προσθήκη μεγάλης δόσης σισπλατίνης. Στην ομάδα αυτή παρατηρείται μείωση στα επίπεδα MDA συγκριτικά με την σισπλατίνη. Εάν και η μείωση είναι πολύ μικρή είναι σημαντική ($p < 0.05$).

Η δόση κουρκουμίνης 16 mg/kg δεν ήταν αποτελεσματική στην ομάδα curc 16 mg/kg+ 5CP mg/kg, αλλά φαίνεται να είναι αποτελεσματική στην μεγάλη δόση σισπλατίνης. Η προσθήκη 4 mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης φαίνεται να είναι αποτελεσματική για την μείωση της MDA και όταν χορηγήθηκε μεγάλη δόση χημειοθεραπευτικού.



Γράφημα 44. Συγκέντρωση MDA στα ούρα μετά από χορήγηση μεγάλης δόσης σισπλατίνης. Τα επίπεδα της MDA μετρήθηκαν με τη χρήση φωτομετρικής μεθόδου του προϊόντος που παράγεται με τη χρήση αντιδραστηρίου TBA. *Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνης, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας συμπεραίνεται ότι η χορήγηση σισπλατίνης σε μικρή και σε μεγάλη δόση αύξησε τα επίπεδα της MDA στα ούρα των επίμυων. Η χορήγηση της κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση μικρής δόσης σισπλατίνης φαίνεται να είναι και το πιο αποτελεσματικό σχήμα χορήγησης, καθώς έφερε μείωση στα επίπεδα της MDA. Επίσης στην χορήγηση μεγάλης δόσης σισπλατίνης η χορήγηση μεγάλης δόσης κουρκουμίνης φαίνεται να φέρει μείωση στα επίπεδα της MDA στα ούρα επίμυων. Φαίνεται ότι, η αποτελεσματικότητα της κουρκουμίνης στα επίπεδα της MDA στα ούρα επίμυων έχει να κάνει με την δόση της σισπλατίνης.

3.2.2 Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων στο πλάσμα πειραματόζων

3.2.2.1 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

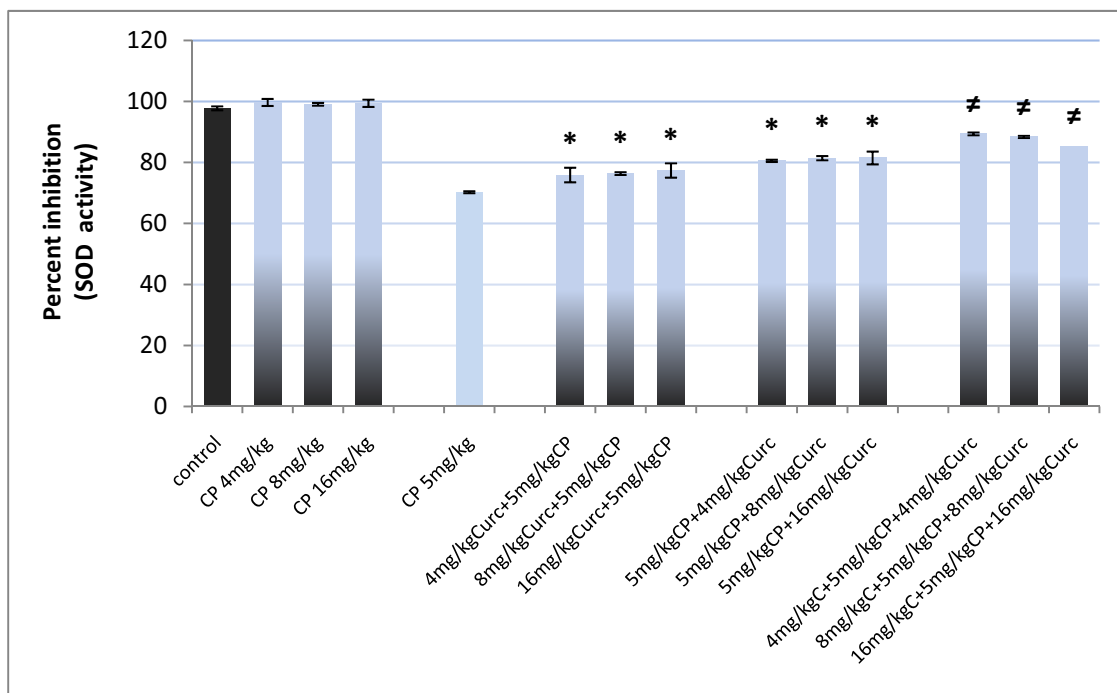
Στο γράφημα 45 απεικονίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) στο πλάσμα επίμυων Wistar. Στο γράφημα παρουσιάζονται η ομάδα control, η ομάδα σισπλατίνης με δόση 5 mg/kg βάρους σώματος, η ομάδα όπου χορηγήθηκε μόνο κουρκουμίνη (4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg βάρους σώματος), η ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη και μετά σισπλατίνη, στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα σισπλατίνη και μετά κουρκουμίνη, και στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη, μετά σισπλατίνη, και πάλι μετά κουρκουμίνη σε δόσεις όπως αναγράφονται.

Το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη στην δόση 5 mg/kg βάρους σώματος προκαλεί μείωση στην δραστηριότητα της SOD στο 27% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τις δόσεις κουρκουμίνης 4mg/kg, 8mg/kg και 16mg/kg βάρους σώματος αύξησαν ελαφρώς την δραστηριότητα του ενζύμου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όπως παρατηρείται από το γράφημα η χορήγηση κουρκουμίνης στα σχήματα συνδιασμού με το χημειοθεραπευτικό αύξησε την δραστηριότητα της SOD σε όλους τους συνδυασμούς και όλες τις δόσεις.

Η χορήγηση κουρκουμίνης πριν την σισπλατίνη, επιφέρει μια μικρή αύξηση στη δραστηριότητα της SOD, 5-7%, συγκριτικά με τη σισπλατίνη μόνη της, η οποία είναι

σημαντική στατιστικά. Δεν υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των δόσεων της κουρκουμίνης, αφού η αύξηση στη δραστηριότητα της SOD, που προκαλούν και οι τρεις δόσεις είναι περίπου η ίδια. Η χορήγηση του αντιοξειδωτικού κουρκουμίνης, μετά τη χορήγηση της σισπλατίνης, έφερε αύξηση στη δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου 10-11% ($p < 0.005$), συγκριτικά με την δόση σισπλατίνης.

Όσον αφορά το σχήμα χορήγησης της κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση χημειοθεραπευτικού φαίνεται να είναι και το πιο αποτελεσματικό σχήμα για την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου SOD. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται αύξηση στην δραστηριότητα της SOD από 15-19% ($p < 0.005$) σχετικά με την δόση σισπλατίνης. Η πιο αποτελεσματική δόση κουρκουμίνης είναι η πιο μικρή δόση (4 mg/kg βάρους σώματος) και όχι η μεγαλύτερη δόση.



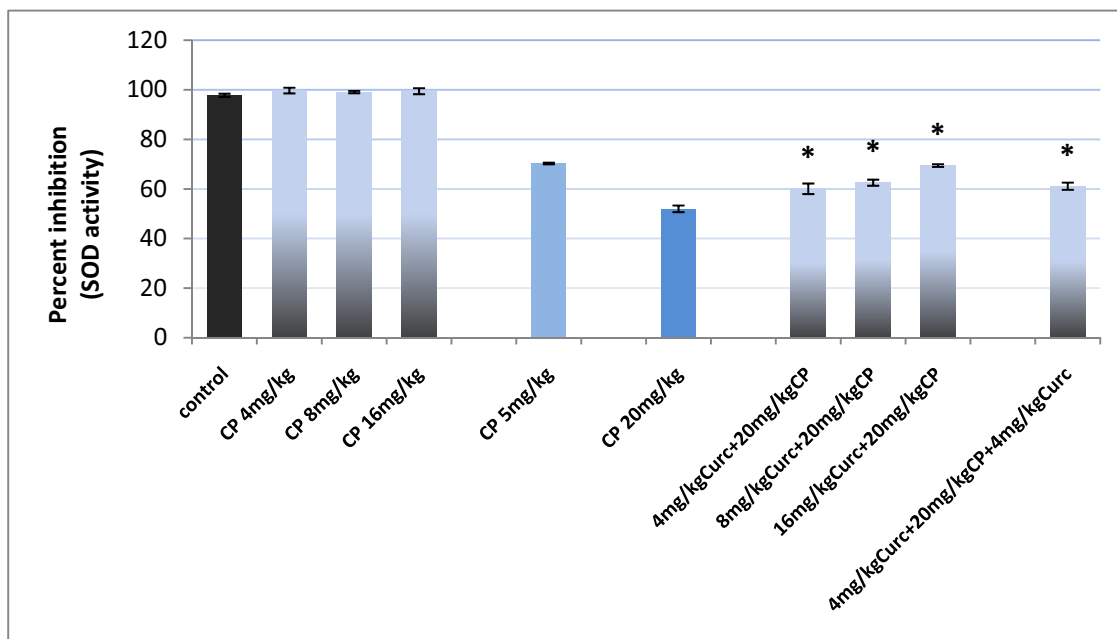
Γράφημα 45. Η δραστηριότητα της SOD στην ομάδα σισπλατίνη 5mg/kg, στις ομάδες κουρκουμίνης και του συνδιασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη SOD εκφράζεται ως % αναστολή του υποστρώματος WST-1. * Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνη $p < 0.05$, # Σημαντικά διαφορετικό από την την από την ομάδα σισπλατίνη $p < 0.005$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

Στο γράφημα 46 απεικονίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) στο πλάσμα επίμυων Wistar. Στο γράφημα παρουσιάζονται η ομάδα control, η ομάδα σισπλατίνης με δόση 20 mg/kg βάρους σώματος, και ο συνδυασμός σισπλατίνης και κουρκουμίνης σε δόσεις όπως αναγράφονται.

Το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη στην δόση 20mg/kg βάρους σώματος προκαλεί μείωση στην δραστηριότητα της SOD στο 45% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όπως παρατηρείται από το γράφημα η χορήγηση κουρκουμίνης στα σχήματα συνδιασμού με το χημειοθεραπευτικό αύξησε την δραστηριότητα της SOD σε όλες τις περιπτώσεις.

Η χορήγηση κουρκουμίνης στη δόση 4mg/kg βάρους σώματος πριν τη σισπλατίνη επιφέρει μια μικρή αύξηση στη δραστηριότητα της SOD στο 8% συγκριτικά με τη σισπλατίνη μόνη της (20mg/kg), η οποία είναι σημαντική στατιστικά ($p<0.005$). Η χορήγηση κουρκουμίνης στη δόση 8mg/kg βάρους σώματος πριν τη σισπλατίνη επιφέρει μια αύξηση στην δραστηριότητα της SOD στο 10%, συγκριτικά με τη σισπλατίνη μόνη της (20mg/kg), η οποία είναι σημαντική στατιστικά ($p<0.005$). Η χορήγηση κουρκουμίνης στη δόση 16mg/kg βάρους σώματος, πριν τη σισπλατίνη, επιφέρει τη μεγαλύτερη αύξηση στην δραστηριότητα της SOD και συγκεκριμένα 17%, συγκριτικά με τη σισπλατίνη μόνη της (20mg/kg), η οποία είναι σημαντική στατιστικά ($p<0.005$). Συγκρίνοντας τη χορήγηση της μεγάλης δόσης πλατίνης και της μικρής δόσης, παρατηρείται ότι στη δόση 5mg/kg σισπλατίνης, η μικρή δόση κουρκουμίνης είναι πιο αποτελεσματική, (σε χορήγηση και πριν) και μετά το χημειοθεραπευτικό. Όσον αφορά την μεγάλη δόση σισπλατίνης, ο συνδυασμός της με την μεγάλη δόση κουρκουμίνης, φαίνεται να είναι η πιο αποτελεσματική.

Η χορήγηση κουρκουμίνης, πριν και μετά τη μεγάλη δόση σισπλατίνης, έφερε αύξηση 9% στη δραστηριότητα της SOD ($p<0.005$).



Γράφημα 46. Η δραστηριότητα της SOD στην ομάδα σισπλατίνη 20mg/kg βάρους σώματος, στις ομάδες κουρκουμίνης και του συνδιασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη SOD εκφράζεται ως % αναστολή του υποστρώματος WST-1. * Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνης $p < 0.005$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

3.2.2.2 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Στο γράφημα 47 απεικονίζεται η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο πλάσμα επίμυων Wistar. Στο γράφημα παρουσιάζονται η ομάδα control, η ομάδα σισπλατίνης με δόση 5 mg/kg βάρους σώματος, στην ομάδα όπου χορηγήθηκε μόνο κουρκουμίνη (4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg βάρους σώματος), στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη και μετά σισπλατίνη, στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα σισπλατίνη και μετά κουρκουμίνη, και στην ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη, μετά σισπλατίνη, και πάλι μετά κουρκουμίνη σε δόσεις όπως αναγράφονται.

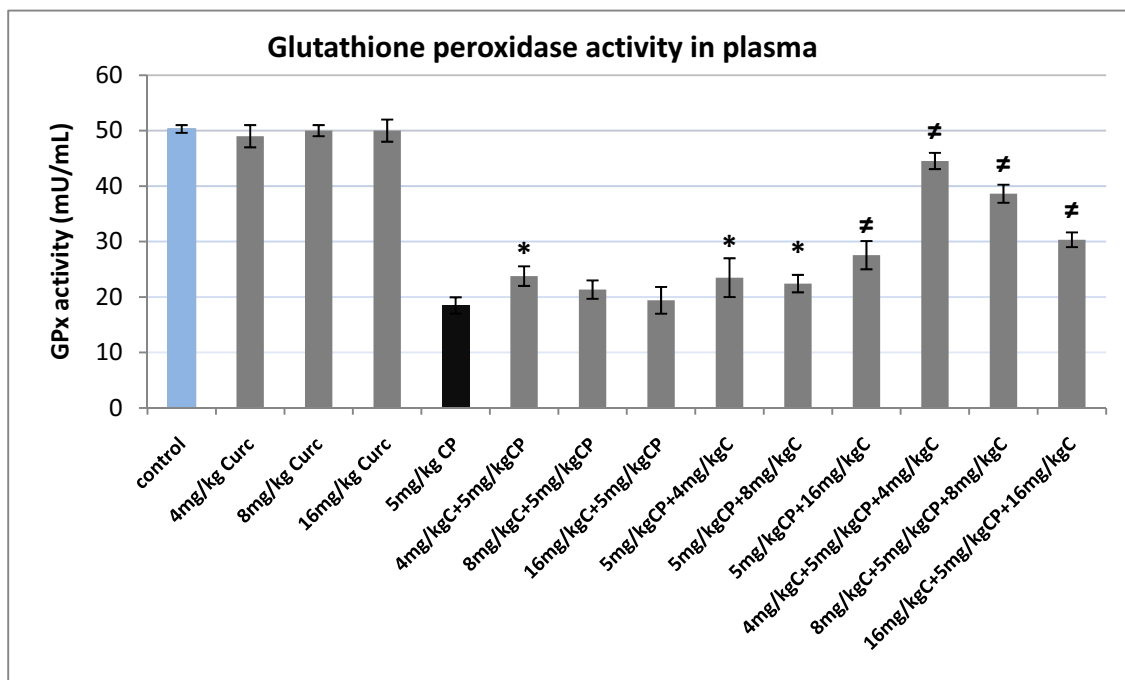
Όπως παρατηρείται η σισπλατίνη στη δόση 5 mg/kg βάρους σώματος επιφέρει μείωση στην δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο 60% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση της κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις δεν έφερε κάποια αλλαγή στην δραστηριότητα του ενζύμου. Όλοι οι συνδυασμοί σισπλατίνης και κουρκουμίνης έφεραν αύξηση στην δραστηριότητα του ενζύμου GPx. Συγκριτικά με την

χορήγηση σισπλατίνης μόνο, η χορήγηση 4 mg/kg δόσης κουρκουμίνης πριν τη χορήγηση της σισπλατίνης έφερε μια αύξηση 22% στην δραστηριότητα της GPx ($p<0.05$). Η δόσεις 8 mg/kg και 16 mg/kg κουρκουμίνης που έλαβαν τα πειραματόζωα πριν την δόση της σισπλατίνης έφεραν αύξηση στην δραστηριότητα της GPx αλλά η αύξηση αυτή δεν είναι σημαντική στατιστικά.

Αντίθετα με την δόση σισπλατίνης, η χορήγηση 4 mg/kg δόσης κουρκουμίνης μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε αύξηση στην δραστηριότητα της GPx ενζύμου 21% ($p<0.05$). Η χορήγηση 8 mg/kg δόσης κουρκουμίνης μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε αύξηση στην δραστηριότητα της GPx ενζύμου 17% ($p<0.05$). Η χορήγηση της μεγαλύτερης δόσης κουρκουμίνης 16 mg/kg μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε αύξηση στην δραστηριότητα της GPx ενζύμου στο 33% ($p<0.005$).

Από το γράφημα παρατηρείται ότι ο συνδυασμός δόσεων κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης φαίνεται να είναι και οι πιο αποτελεσματικές στην αύξηση της δραστηριότητας της GPx ενζύμου. Συγκεκριμένα η δόση 4 mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε την μεγαλύτερη αύξηση στην δραστηριότητα του GPx ενζύμου σε σχέση με την σισπλατίνη μόνη της, μια αύξηση που ανέρχεται στο 58% ($p<0.005$).

Η δόση 8 mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε αύξηση 52% στην δραστηριότητα της GPx συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της ($p<0.005$). Η δόση 16 mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης έφερε αύξηση 39% στην δραστηριότητα της GPx συγκριτικά με την σισπλατίνη μόνη της ($p<0.005$).

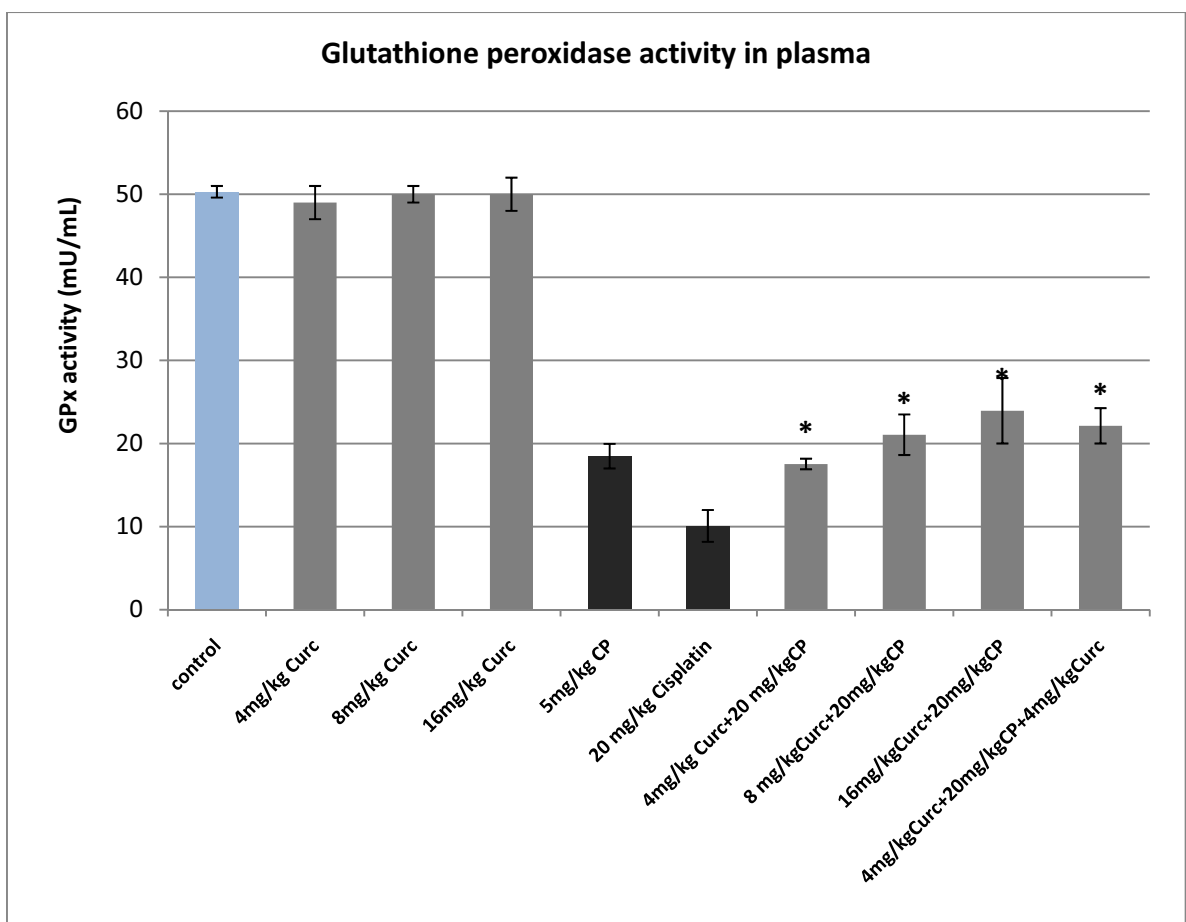


Γράφημα 47. Η δραστηριότητα της GPx στην ομάδα σισπλατίνη 5mg/kg, στις ομάδες κουρκουμίνης και του συνδυασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη GPx εκφράζεται ως mU/mL * Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνη $p < 0.05$, # Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνη $p < 0.005$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο γράφημα 48 απεικονίζεται η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο πλάσμα επίμυων Wistar. Στο γράφημα παρουσιάζονται η ομάδα control, η ομάδα σισπλατίνης με δόση 20 mg/kg βάρους σώματος, η ομάδα όπου χορηγήθηκε μόνο κουρκουμίνη (4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg βάρους σώματος), η ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη και μετά σισπλατίνη, και η ομάδα όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη, μετά σισπλατίνη, και πάλι μετά κουρκουμίνη σε δόσεις όπως αναγράφονται.

Όπως παρατηρείται η σισπλατίνη στη μεγάλη δόση των 20 mg/kg βάρους σώματος επιφέρει μια μείωση στην δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο 79% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρά την μεγάλη δόση σισπλατίνης η χορήγηση της κουρκουμίνης σε συνδυασμό και με την σισπλατίνη έφερε αύξηση στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στο πλάσμα πειραματόζων. Συγκεκριμένα η

χορήγηση 4mg/kg βάρους σώματος κουρκουμίνης αύξησε στο 42% το ένζυμο GPx σε σχέση με την σισπλατίνη ($p < 0.005$). Η χορήγηση 8mg/kg βάρους σώματος κουρκουμίνης αύξησε στο 52% το ένζυμο GPx σε σχέση με την σισπλατίνη ($p < 0.005$). Η χορήγηση 16mg/kg βάρους σώματος κουρκουμίνης αύξησε στο 57% τη δραστηριότητα του ένζυμο GPx σε σχέση με την σισπλατίνη ($p < 0.005$), και σε αυτήν την δόση παρατηρείται και η μεγαλύτερη αύξηση. Η χορήγηση 4mg/kg βάρους σώματος κουρκουμίνης πριν και μετά την δόση της σισπλατίνης αύξησε στο 54% το ένζυμο GPx σε σχέση με την σισπλατίνη ($p < 0.005$).



Γράφημα 48. Η δραστηριότητα της GPx στην ομάδα σισπλατίνη 20mg/kg, στις ομάδες κουρκουμίνης και του συνδιασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη GPx εκφράζεται ως mU/mL * Σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα σισπλατίνη $p < 0.005$, Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α

3.2.3 Αποτελέσματα εξετάσεων αίματος, διατροφικών και μεταβολικών δεικτών επίμυων μετά από χορήγηση σισπλατίνης και κουρκουμίνης

Στους πίνακες 7 και 8 απεικονίζονται αντίστοιχα η γενική αίματος και οι βιοχημικές εξετάσεις για την ομάδα ελέγχου και την κουρκουμίνη στις 3 χορηγούμενες δόσεις.

	Control	Κουρκουμίνη 4mg/kg	Κουρκουμίνη 8mg/kg	Κουρκουμίνη 16mg/kg
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)	7,88±0,21	7,67±0,11	7,55±0,18	8,7±0,16
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	4,7±0.85	3,8±0.75	4,0±0.69	4,5±0.64
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,6±0,59	14,2±0,47	12,3±0,51	14±0,49
Αιματοκρίτης (%)	40,7±1.26	43±1.21	34,5±1.18	45±1.24
Αιμοπετάλια (μL)	773±86,87	810±78,21	779±84,15	800±75.05

Πίνακας 7. Αιματολογικές εξετάσεις επίμυων για την ομάδα ελέγχου και ομάδας κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις.

	Control	Κουρκουμίνη 4mg/kg	Κουρκουμίνη 8mg/kg	Κουρκουμίνη 16mg/kg
Ουρία (mg/dL)	52,9±1,87	26,4±1,85	32,4±1,71	47,3±1,68
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,71±0,05	0,43±0.001	0,41±0,03	0,38±0,12
Χοληστερίνη (mg/dL)	67±9,2	119±4.3	100±5.2	69±6,1
Τριγλυκερίδια	32±5,4	36±8.4	38±1.3	34±2.2
Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/l)	131,2±1,87	65,0±1.21	135,9±1,52	75,7±1.23
Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/l)	60,0±12,8	41,6±15.2	57,4±9.8	45,5±13.1
γ-GT (U/L)	1,0±0.03	1,0±0.03	1,0±0.01	1,0±0.1
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,71±0.08	0,62±0.11	0,89±0.01	0,50±0.21

Πίνακας 8. Βιοχημικές εξετάσεις επίμυων για την ομάδα ελέγχου και ομάδας κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις.

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα, η χορήγηση κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις που χορηγήθηκε, δεν επέφερε κάποια σημαντική διαφορά στη γενική αίματος των επίμυων, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τις βιοχημικές εξετάσεις, παρατηρείται ότι η δόση των 4mg/kg κουρκουμίνης και αυτή των 8mg/kg επιφέρουν μία αύξηση στη χοληστερίνη, σχετικά με την ομάδα control. Η δόση 4mg/kg κουρκουμίνης και αυτή των 16mg/kg επιφέρουν μια μείωση στην τρανσαμινάση S-GOT ($p < 0.05$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Και οι τρεις δόσεις κουρκουμίνης επιφέρουν μείωση στην τρανσαμινάση (S-GPT) ($p < 0.05$). Η αύξηση στο ουρικό οξύ από την δόση των 8mg/kg κουρκουμίνης, μπορεί να εξηγηθεί με τη αυξημένη διούρηση που είχαν οι επίμυες.

Στον πίνακα 9 και στον πίνακα 10 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι διατροφικοί και οι μεταβολικοί δείκτες και το βάρος οργάνων πειραματόζων στην ομάδα ελέγχου και στις ομάδες όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη (4mg/kg, 8mg/kg, 16mg/kg). Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν 1 μέρα μετά την χορήγηση σισπλατίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται μια αυξημένη διουρητική ικανότητα των πειραματόζων στις δυο μεγάλες δόσεις της κουρκουμίνης. Δεν υπάρχει κάποια άλλη μεταβολή στους διατροφικούς και μεταβολικούς δείκτες των επίμυων.

	Control	Κουρκουμίνη 4mg/kg	Κουρκουμίνη 8mg/kg	Κουρκουμίνη 16mg/kg
Κατανάλωση τροφής (gr)	16,5±2,7	11,6±1,4	12,6±3.2	10±1,1
Πρόσληψη νερού (ml)	25±6,7	25±1,1	22±2.2	25±3,2
Αποβολή ούρων (ml)	6±4,9	9,6±3,2	22±1.1	24±0.01
Βάρος κοπράνων (gr)	3,4±1,8	1,6±1,2	2,4±0.03	2,2±0,1
Ισοζύγιο νερού (ml)	19	15,4	0	1

Πίνακας 9. Διατροφικοί και μεταβολικοί δείκτες επίμυων για την ομάδα ελέγχου και ομάδες κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις

	Control	Κουρκουμίνη 4mg/kg	Κουρκουμίνη 8mg/kg	Κουρκουμίνη 16mg/kg
Πνεύμονας (gr)	1,5±1,1	2,2±0.003	1,2±1,1	1,7±1,1
Καρδιά (gr)	1,3±1,4	0,7±0,1	0,7±0.9	1,1±0,21
Σπλήνας (gr)	1,0±0,1	0,7±0,21	0,3±0,5	0,8±0,11
Ήπαρ (gr)	8,8±0.05	8,2±0,14	8,8±0.01	7,5±1,5
Νεφροί (gr)	1,8±1,2	2,0±0,3	1,6±0,1	1,6±0,31

Πίνακας 10. Βάρους οργάνων πειραματοζώων για την ομάδα ελέγχου και μετά από χορήγηση 3 δόσεων κουρκουμίνης

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα του πίνακα 10 η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κουρκουμίνης και στις 3 δόσεις δεν έφερε κάποια μεταβολή στο βάρος οργάνων των επίμυων.

Στους πίνακες 11, 12, 13, 14 παρουσιάζονται η γενική αίματος, οι βιοχημικές εξετάσεις, οι διατροφικοί και οι μεταβολικοί δείκτες και το βάρος των οργάνων των επίμυων, όταν χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη στις δόσεις των 4 mg/kg, 8 mg/kg και 16 mg/kg και μετά ακολούθησε η ενδοπεριτοναϊκή δόση σισπλατίνης σε δόση 5 mg/kg

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)	7,88±0,21	7.63±0.13	8.11±0.24	7.69±0.10	8.04±0.25
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	4,7±0.85	6.1±0,80	2.1±0.53	4.1±0,44	4.6±0.71
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,6±0,59	13±0.67	15.10±0.35	12.90±0.38	13.80±0.28
Αιματοκρίτης (%)	40,7±1.26	39±1,31	45.20±1.35	38.90±1.12	41.30±1.19
Αιμοπετάλια (μL)	773±86,87	847±74,31	894±68,23	733±90.21	894±80.78

Πίνακας 11. Γενική εξέταση αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα τις κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις και μετά σισπλατίνης 5mg/kg

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP	8mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP
Ουρία (mg/dL)	52,9±1,87	38.91±1,91	33.2±1,34	37.7±1.23	36.8±1,13
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,71±0,05	0.40±0.1	0.98±0.03	0.64±0,01	0.57±0,04
Χοληστερίνη (mg/dL)	67±9,2	65±8,4	142±10,3	101±7,0	59±3,2
Τριγλυκερίδια	32±5,4	17±3,8	17±7,3	16±4,1	42±2,5
Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/I)	131,2±1,87	61.3±1,21	155.1±1,59	105.1±1.91	125.3±1,34
Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/I)	60,0±12,8	26.9±15.3	42.6±10,4	30.6±14.8	23.3±15,6
γ-GT (U/L)	1,0±0.03	1.0±0,01	1.7±0.05	1.2±0,03	2.7±0,05
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,71±0.08	0.29±0,04	2.14±0,01	1.34±0,08	1.71±0,02

Πίνακας 12. Βιοχημικές εξετάσεις αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα τις κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις και μετά σισπλατίνης 5mg/kg ομάδα.

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	4mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	8mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	16mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP
Κατανάλωση τροφής (gr)	16,5±2,7	7,5±3,1	9,7±4,2	4,6±1,5	5,2±2,6
Πρόσληψη νερού (ml)	25±6,7	30±4,5	25±7,3	25±8,2	25±5,2
Αποβολή ούρων (ml)	6±4,9	26±5,3	12±2,3	26±1,6	14±6,2
Βάρος κοπράνων(gr)	3,4±1,8	2,3±1,7	-	0,4±1,5	0,8±2
Ισοζύγιο νερού (ml)	19	4	13	1	11

Πίνακας 13. Διατροφικοί και μεταβολικοί δείκτες επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα τις κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις και μετά σισπλατίνης 5mg/kg.

	Control	Σισπλατίνη 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκουμίνη+ 5 mg/kg CP
Πνεύμονας (gr)	1,5±1,1	1,2±0,1	2±1,2	1,5±0,05	1.9±0,4
Καρδιά (gr)	1,3±1,4	0,8±1,6	1,3±1,3	1±0,9	0,9±0,7
Σπλήνας (gr)	1,0±0,1	0,4±0,4	1±0,8	0,7±0,3	0,7±0,6
Ήπαρ (gr)	8,8±0.05	8,3±0,3	8,4±0,6	8,5±0,8	6,7±0,1
Νεφροί (gr)	1,8±1,2	1,5±0,9	1,7±0,5	1,9±0,7	1,5±0,3

Πίνακας 14. Βάρος οργάνων πειραματοζώων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης στις 3 χορηγούμενες δόσεις και μετά της σισπλατίνης 5mg/kg.

Από τα αποτελέσματα των εξετάσεων της γενικής αίματος, παρατηρείται ότι η σισπλατίνη στην δόση των 5mg/kg, προκάλεσε μείωση στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p < 0.05$) και αύξηση στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων ($p < 0.05$), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η σισπλατίνη, επίσης, προκάλεσε και αύξηση στον αριθμό των αιμοπεταλίων ($p < 0.05$). Στη συνέχεια, παρατηρείται ότι όταν πριν από τη σισπλατίνη χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης (16 mg/kg), υπάρχει μια αποκατάσταση στους αιματολογικούς δείκτες.

Όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες, η σισπλατίνη προκαλεί μείωση σε όλους τους δείκτες, που αποτελούν ενδείξεις για βλάβες στα νεφρά και στο ήπαρ. Στην περίπτωση, όπου είχαμε χορήγηση κουρκουμίνης πριν από τη σισπλατίνη, παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις στις βιοχημικές εξετάσεις, αλλά καμία δόση της κουρκουμίνης δεν μπορεί να επαναφέρει τους δείκτες στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα διατροφικών και μεταβολικών δεικτών στην χορήγηση σισπλατίνης παρατηρείται μειωμένη κατανάλωση τροφής, αυξημένη κατανάλωση νερού και αυξημένη αποβολή ούρων που πιθανώς να συνδέεται με κάποια βλάβη στα νεφρά. Δεν παρατηρείται κάποια βελτίωση στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη πιο πριν.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα για τους διατροφικούς και μεταβολικούς δείκτες μετά τη χορήγηση σισπλατίνης παρατηρείται μειωμένη κατανάλωση τροφής, αυξημένη κατανάλωση νερού και αυξημένη αποβολή ούρων, που πιθανώς να συνδέεται με κάποια

βλάβη στα νεφρά. Δεν παρατηρείται κάποια βελτίωση στην περίπτωση, όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη πιο πριν.

Όσον αφορά το βάρος των οργάνων, δεν υπάρχει κάποια διαφορά με τη χορήγηση σισπλατίνης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά ούτε στην περίπτωση συνδυασμού σισπλατίνης με κουρκουμίνη.

Στους πίνακες 15, 16, 17, 18 παρουσιάζονται η γενική αίματος, οι βιοχημικές εξετάσεις, οι διατροφικοί και οι μεταβολικοί δείκτες και το βάρος οργάνων επίμυων στο σχήμα όπου χορηγήθηκε πρώτα σισπλατίνη στη δόση 5 mg/kg και ακολούθησαν οι τρεις δόσεις κουρκουμίνης στις δόσεις 4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg. Οι επίμυες θυσιάστηκαν 4 μέρες μετά την χορήγηση σισπλατίνης.

	Control	Σισπλάτην 5mg/kg	5 mg/kg CP + 4 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP + 8 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP+16 mg/kg κουρκουμίνη
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (M/μl)	7,88±0,21	7.63±0.13	7.64±1.23	7.40±0.18	6.71±0.87
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	4,7±0.85	6.1±0,80	3.3±0.57	7.8±0.81	4.9±0.34
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,6±0.59	13±0.67	12.9±0.45	12.50±0.68	11.20±0.19
Αιματοκρίτης (%)	40,7±1.26	39±1,31	38.70±1.21	37.90±1.57	34±1.37
Αιμοπετάλια (μl)	773±86,87	847±74,31	714±82.21	955±90.34	891±51.36

Πίνακας 15. Γενική εξέταση αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της σισπλατίνης 5mg/kg και μετά χορήγηση κουρκουμίνης στις 3 δόσεις

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	5 mg/kg CP+4 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP+ 8 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP+ 16 mg/kg κουρκουμίνη
Ουρία (mg/dL)	52,9±1,87	38.91±1,91	35.4±1.75	30.1±1.36	28.6±1.23
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,71±0,05	0.40±0.1	0.50±0.6	0.44±0.09	0.33±0.3
Χοληστερίνη (mg/dL)	67±9,2	65±8,4	47±7.5	60±5.2	47±8.3
Τριγλυκερίδια	32±5,4	17±3,8	20±4.9	22±7.5	25±2.3
Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/l)	131,2±1,87	61.3±1,21	62.3±1.34	78.8±1.87	60.9±1.45
Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/l)	60,0±12,8	26.9±15.3	26.1±14.8	33.5±13.2	27.4±12.9
γ-GT (U/L)	1,0±0.03	1.0±0,01	1.0±0.05	1.0±0.07	0.0±0.02
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,71±0.08	0.29±0,04	1.22±0.06	0.70±0.09	0.44±0.03

Πίνακας 16. Βιοχημικές εξετάσεις αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της σισπλατίνης 5mg/kg και μετά χορήγηση κουρκουμίνης στις 3 δόσεις

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	5 mg/kg CP + 4 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP + 8 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP+16 mg/kg κουρκουμίνη
Κατανάλωση τροφής (gr)	16,5±2,7	7,5±3,1	14,7±4.6	12,9±2.1	15,9±3.2
Πρόσληψη νερού (ml)	25±6,7	30±4,5	25,3±2.3	45±1.5	50±3.2
Αποβολή ούρων (ml)	6±4,9	26±5,3	30±2.1	26±3.4	22±2.5
Βάρος κοπράνων(gr)	3,4±1,8	2,3±1,7	2,4±1.4	0,8±2.2	3,2±1.5
Ισοζύγιο νερού	19	4	-4,7	19	28

Πίνακας 17. Διατροφικοί και μεταβολικοί δείκτες επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της σισπλατίνης 5mg/kg ομάδα και μετά χορήγηση κουρκουμίνης στις 3 δόσεις

	Control	Σισπλατίνη 5mg/kg	5 mg/kg CP + 4 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP + 8 mg/kg κουρκουμίνη	5 mg/kg CP+16 mg/kg κουρκουμίνη
Πνεύμονας (gr)	1,5±1,1	1,2±0,2	1,1±0,4	1,1±0,3	1,4±0,6
Καρδιά (gr)	1,3±1,4	0,8±0,09	0,9±0,6	0,9±1,4	0,5±1,2
Σπλήνας (gr)	1,0±0,1	0,4±1.3	0,3±1,7	0,4±0,2	0,3±0,5
Ήπαρ (gr)	8,8±0.05	8,3±2.1	7±1,1	8,1±1,1	7,8±0,5
Νεφροί (gr)	1,8±1,2	1,5±0.1	1,3±0,5	1,3±1,3	1,1±1,4

Πίνακας 18. Βάρος οργάνων πειραματοζώων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της σισπλατίνης 5mg/kg ομάδα και μετά χορήγηση κουρκουμίνης στις 3 δόσεις

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα εξετάσεων της γενικής αίματος των πειραματοζώων, καθώς και στις περιπτώσεις, όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη μετά τη χορήγηση σισπλατίνης, φαίνεται να υπάρχει μείωση στον αιματοκρίτη, αύξηση στον αριθμό των αιμοπεταλίων και μείωση της αιμοσφαιρίνης. Επισημαίνουμε ότι η δράση της σισπλατίνης διήρκησε για πιο πολλές μέρες σε αυτήν την περίπτωση και γι' αυτό έχουμε και παραπάνω πτώση των δεικτών της γενικής εξέτασης αίματος. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στις βιοχημικές εξετάσεις. Η χορήγηση της κουρκουμίνης μετά τη σισπλατίνη δεν μπορεί να επαναφέρει τους βιοχημικούς δείκτες στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

Σχετικά με τους διατροφικούς δείκτες, παρατηρείται μια αύξηση στην κατανάλωση τροφής και αυξημένη πρόσληψη νερού.

Όσον αφορά το βάρος των οργάνων, παρατηρείται μείωση του βάρους του σπλήνα και των νεφρών

Στους πίνακες 19, 20, 21, 22 παρουσιάζονται η γενική αίματος, οι βιοχημικές εξετάσεις, οι διατροφικοί και οι μεταβολικοί δείκτες και το βάρος των οργάνων των επίμυων στο σχήμα, όπου χορηγήθηκε πρώτα κουρκουμίνη, ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης στη δόση 5 mg/kg και μετά πάλι χορήγηση κουρκουμίνης και για τις τρεις δόσεις των 4 mg/kg, 8 mg/kg και 16 mg/kg. Οι επίμυες θυσιάστηκαν 6 μέρες μετά τη χορήγηση σισπλατίνης.

	Control	Σισπλάτην 5mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP + 4 mg/kg κουρκουμίνη	8 mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP + 8 mg/kg κουρκουμίνη	16 mg/kg κουρκουμίνη 5 mg/kg CP+16 mg/kg κουρκουμίνη
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)	7,88±0,21	7.63±0.13	7.32±0,21	7.17±0,34	7.64±0,51
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	4,7±0.85	6.1±0,80	4.8±0,5	6.6±0,2	5.4±1,1
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,6±0,59	13±0.67	12.30±0,54	12.10±0,71	13.30±0,82
Αιματοκρίτης (%)	40,7±1.26	39±1,31	36.80±1,42	36.30±1,54	40±1,63
Αιμοπετάλια (μl)	773±86,87	847±74,31	837±21	1029±31,1	719±42,6

Πίνακας 19. Γενική εξέταση αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης της κουρκουμίνης, ακολούθησε δόση σισπλατίνης 5mg/kg και μετά χορήγηση πάλι της κουρκουμίνης και στις 3 δόσεις.

	Control	Σισπλάτην 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+4 mg/kg κουρκουμίνη	8mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+8 mg/kg κουρκουμίνη	16mg/kg κουρκουμίνη + 5 mg/kg CP+16mg/kg κουρκουμίνη
Ουρία (mg/dL)	52,9±1,87	38.91±1,91	35.3±1,21	33.2±1,45	42,7±1,34
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,71±0,05	0.40±0.1	0.38±0,06	0.38±0,09	0.61±0,02
Χοληστερίνη (mg/dL)	67±9,2	65±8,4	57±7,1	55±6,2	34±5,3
Τριγλυκερίδια	32±5,4	17±3,8	22±3,3	20±2,3	29±4,2
Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/l)	131,2±1,87	61.3±1,21	58.7±1,4	61.4±1,7	72.6±1,3
Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/l)	60,0±12,8	26.9±15.3	30±13,2	38.2±14,4	43.7±18,6
γ-GT (U/L)	1,0±0.03	1.0±0,01	1.0±0,02	1.0±0,03	1.0±0,05
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,71±0.08	0.29±0,04	0.74±0,05	0.80±0,08	0.61±0,06

Πίνακας 20. Βιοχημικές εξετάσεις αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης, μετά ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg και έπειτα χορήγηση κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις.

	Control	Σισπλατίνη 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+4 mg/kg κουρκουμίνη	8mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+8 mg/kg κουρκουμίνη	16mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+16mg/kg κουρκουμίνη
Κατανάλωση τροφής (gr)	16,5±2,7	7,5±3,1	10,9±2,2	12±2,3	10,6±3,4
Πρόσληψη νερού (ml)	25±6,7	30±4,5	25±3,6	45±4,4	25±5,9
Αποβολή ούρων (ml)	6±4,9	26±5,3	12±4,2	26±2,1	12±4,6
Βάρος κοπράνων(gr)	3,4±1,8	2,3±1,7	2,4±1,1	2,3±0,5	2,8±2,0
Ισοζύγιο νερού	19	4	13	29	13

Πίνακας 21. Διατροφικοί και μεταβολικοί δείκτες επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης, μετά ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg και πάλι χορήγηση κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις.

	Control	Σισπλατίνη 5 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+4 mg/kg κουρκουμίνη	8mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+8 mg/kg κουρκουμίνη	16mg/kg κουρκουμίνη +5 mg/kg CP+16mg/kg κουρκουμίνη
Πνεύμονας (gr)	1,5±1,1	1,2±0,2	1,4±0,3	1,1±0,8	1,4±0,5
Καρδιά (gr)	1,3±1,4	0,8±0,09	0,6±0,05	0,7±0,4	0,7±0,2
Σπλήνας (gr)	1,0±0,1	0,4±1,3	0,2±1,1	0,4±0,3	0,3±0,5
Ήπαρ (gr)	8,8±0,05	8,3±2,1	7,1±1,3	7,8±1,5	7,8 ±1,3
Νεφροί (gr)	1,8±1,2	1,5±0,1	1,3±0,5	1,1±0,4	1,5±0,6

Πίνακας 22. Βάρος οργάνων επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης, μετά ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg και πάλι χορήγηση κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις.

Σύμφωνα με τις εξετάσεις γενικής αίματος επίμυων στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη πριν και μετά την δόση σισπλατίνης παρατηρείται ότι στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης 16mg/kg υπάρχει μια επαναφορά των δεικτών της γενικής αίματος στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Παρατηρείται μείωση του αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων σχετικά με την σισπλατίνη ($p < 0.05$), αύξηση στον

αιματοκρίτη και των αιμοπεταλίων συγκριτικά με την ομάδα σισπλατίνης αλλά και με τα άλλα σχήματα χορήγησης. Όσον αφορά τις βιοχημικές εξετάσεις και εδώ παρατηρείται μια βελτίωση στους βιοχημικούς δείκτες στην περίπτωση όπου χορηγείται 16mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά την δόση σισπλατίνης. Παρατηρείται βελτίωση η οποία είναι στατιστικώς σημαντικά στην ουρία, την κρεατινίνη, το ουρικό οξύ και την τρανσαμινάση S-GPT.

Σχετικά με τους διατροφικούς δείκτες παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη νερού εκτός από την περίπτωση όπου χορηγείται μεγάλη δόση κουρκουμίνης πριν και μετά την σισπλατίνη. Όσο αφορά το βάρος των οργάνων παρατηρείται μείωση στο βάρος του σπλήνα στην ομάδα σισπλατίνης

Στους πίνακες 23, 24, 25,26 παρουσιάζονται η γενική αίματος, οι βιοχημικές εξετάσεις, οι διατροφικοί και οι μεταβολικοί δείκτες και το βάρος οργάνων επίμυων όπου χορηγήθηκε μεγαλύτερη δόση σισπλατίνης και συγκεκριμένα 20 mg/kg. Τα περισσότερα πειραματόζωα κατέληξαν καθώς η δόση αυτή της σισπλατίνης ήταν πολύ τοξική. Οπότε δεν ήταν δυνατών και η χορήγηση κουρκουμίνης μετά την δόση σισπλατίνης. Οι επίμυες σε αυτήν την περίπτωση παρουσίασαν και μειωμένη κινητικότητα.

	Control	Σισπλάτην 20 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)	7,88±0,21	8.59±0.32	8.31±0.45	7.99±1.22	8.53±0.54
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	4,7±0.85	3.3±0.74	3.7±0.23	3.9±0.54	3.5±0.69
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,6±0,59	14.60±0.42	13,50±0.85	13.30±0.74	14.70±0.41
Αιματοκρίτης (%)	40,7±1.26	43.8±1.56	42.5±1.25	40±1.32	44±1.65
Αιμοπετάλια (μL)	773±86,87	764±54.23	782±56.93	815±21.32	1030±54.69

Πίνακας 23. Γενική εξέταση αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης και στις τρεις δόσεις και μετά ακολούθησε δόση σισπλατίνης 20mg/kg.

	Control	Σισπλάτιν 20 mg/kg	4 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκουμίνη+ 20 mg/kg CP
Ουρία (mg/dL)	52,9±1,87	70.3±1.32	75.5±1.75	49.9±2.1	94.3±1.58
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,71±0,05	0.67±0.09	0.73±0.1	0.62±0.04	0.66±0.2
Χοληστερίνη (mg/dL)	67±9,2	28±8.6	54±7.5	85±6.2	44±4.5
Τριγλυκερίδια	32±5,4	6±6.2	13±3.2	10±6.7	8±8.1
Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/I)	131,2±1,87	171.5±1.61	221.5±2.0	182.4±2.1	175.5±1.32
Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/I)	60,0±12,8	68±11	52.7±10.2	34.2±9.6	37.8±15.2
γ-GT (U/L)	1,0±0.03	1.0±0.02	1.9±0.08	1.0±0.04	2.2±0.03
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,71±0.08	0.56±0.05	2.22±0.06	1.42±0.01	1.99±0.1

Πίνακας 24. Βιοχημικές εξετάσεις αίματος επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης στις τρεις δόσεις, και μετά ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης 20mg/kg.

	Control	Σισπλάτιν 20mg/kg	4 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP
Κατανάλωση τροφής (gr)	16,5±2,7	0,6±1.4	1,2±3.1	2±0.5	3,8±1.1
Πρόσληψη νερού (ml)	25±6,7	25±7.2	20±5.2	10±3.2	25±4.1
Αποβολή ούρων (ml)	6±4,9	20±6.3	30±3.2	18±4.1	26±6.2
Βάρος κοπράνων(gr)	3,4±1,8	0,9±0.2	0,7±2.0	1,2±1.3	-

Πίνακας 25. Διατροφική και μεταβολική δείκτες επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης στις τρεις δόσεις, και μετά ακολούθησε χορήγηση σισπλατίνης 20mg/kg

	Control	Σισπλατίν 20mg/kg	4 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP	8 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP	16 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP	4 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP+4 mg/kg κουρκ	8 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP+8 mg/kg κουρκ	16 mg/kg κουρκ+ 20 mg/kg CP+16 mg/kg κουρκ
Πνεύμονας (gr)	1,5±1,1	1,2±0,5	1,3±0,3	1±0,6	2,1±0,7	1,8±0,5	2,5±1.1	1,7±0,9
Καρδιά (gr)	1,3±1,2	0,8±1,1	1,2±0,5	0,7±0,3	1,1±0,3	1,1±1,2	1,1±0,1	1,3±1,1
Σπλήνας (gr)	1,0±0,2	0,4±0,1	0,6±0,1	0,4±0,8	0,7±0,9	0,5±1,1	0,7±0,2	0,6±1,2
Ήπαρ (gr)	8,8±0,4	8,3±1,2	6±1,1	8,5±0,9	6,4±0,6	6±0,9	7,8±1,2	6,3±1,1
Νεφροί (gr)	1,8±0,3	1,5±0,5	1,8±0,1	1,9±1,2	1,7±0,3	2,2±0,8	2,5±0,1	2,6±1,3

Πίνακας 26. Βάρος οργάνων επίμυων για την ομάδα ελέγχου, και το σχήμα χορήγησης πρώτα της κουρκουμίνης και μετά χορήγηση μεγάλης δόσης σισπλατίνης 20mg/kg, καθώς και το σχήμα χορήγησης της κουρκουμίνης πριν και μετά την χορήγηση σισπλατίνης 20mg/kg.

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα με τις εξετάσεις γενικής αίματος η δόση 20mg/kg σισπλατίνης προκαλεί μείωση στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και στα αιμοπετάλια. Επίσης προκαλεί αύξηση στην αιμοσφαιρίνη και στον αιματοκρίτη. Στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε η δόση κουρκουμίνης 8mg/kg πριν την σισπλατίνη φαίνεται να αποκαθίστανται πιο πολύ οι δείκτες γενικής αίματος.

Στις βιοχημικές εξετάσεις παρατηρείται ότι η δόση σισπλατίνης 20mg/kg προκαλεί αύξηση της ουρίας, μείωση της κρεατινίνης, αύξηση των τρανσαμινασών και μείωση στο ουρικό οξύ. Όταν χορηγήθηκε η δόση κουρκουμίνης 8mg/kg φαίνεται να υπάρχει μια αποκατάσταση στην ουρία και την κρεατινίνη.

Όσον αφορά τους διατροφικούς δείκτες στην ομάδα σισπλατίνης, παρατηρείται μειωμένη πρόσληψη τροφής και αυξημένη αποβολή ούρων. Στις ομάδες, όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη, παρατηρείται κάποια βελτίωση στην κατανάλωση τροφής. Στην ομάδα, όπου χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης, δεν παρατηρήθηκε αποβολή κοπράνων.

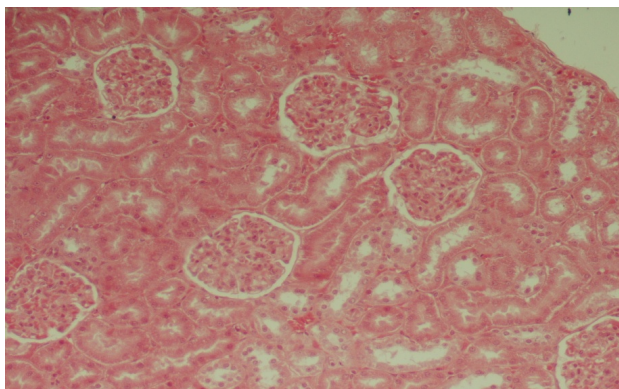
3.2.4 Αποτελέσματα παθολογοανατομικής μελέτης

Κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε, στους επίμυες ανευρέθηκε οίδημα ουροφόρων σωληναρίων (πολύ ήπιο) όταν χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης 16mg/kg. Αυτό δικαιολογείται από τη μεγάλη αποβολή ούρων που είχαν τα πειραματόζωα.

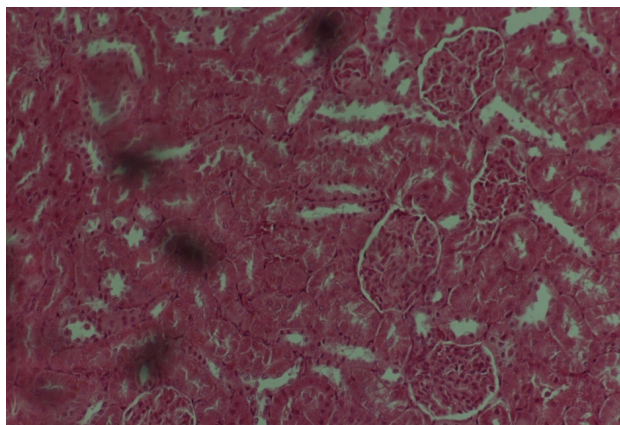
Όταν χορηγήθηκε η μικρή δόση σισπλατίνης 5mg/kg ο ιστός του νεφρού παρουσίασε φυσιολογική εικόνα. Στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε η μεγάλη δόση σισπλατίνης 20mg/kg ο νεφρός παρουσίασε ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων. Η χορήγηση μεγάλης δόσης κουρκουμίνης πριν την δόση σισπλατίνης 5mg/kg αλλά και στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε μετά την σισπλατίνη ο νεφρός παρουσίασε φυσιολογική εικόνα.

Στην περίπτωση όπου χορηγήθηκαν 8mg/kg κουρκουμίνης, πριν και μετά την δόση σισπλατίνης (5 mg/kg) όπως και στην περίπτωση όπου χορηγήθηκαν 16mg/kg κουρκουμίνης, πριν και μετά την δόση σισπλατίνης (5 mg/kg) ο ιστός του νεφρού παρουσίασε ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων. Ενώ όταν χορηγήθηκαν 4mg/kg κουρκουμίνης, πριν και μετά την δόση σισπλατίνης 20 mg/kg, ο ιστός του νεφρού παρουσίασε ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων.

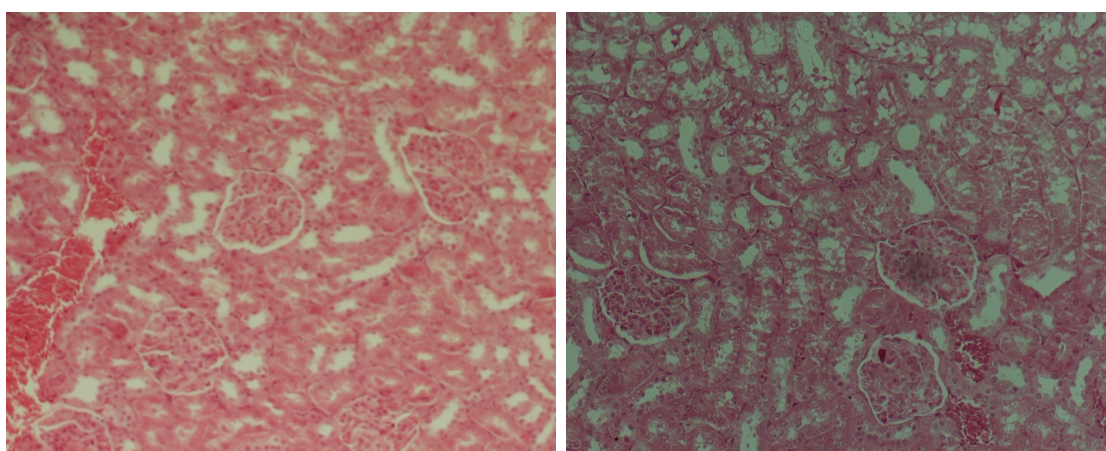
Η παθολογοανατομική εξέταση του ιστού του ήπατος δεν έδειξε κάποια βλάβη μετά από χορήγηση κουρκουμίνης, σισπλατίνης καθώς και του συνδυασμού σισπλατίνης και κουρκουμίνης. Για τον λόγο αυτό δέν παρουσιάζονται όλες οι εικόνες του ήπατος.



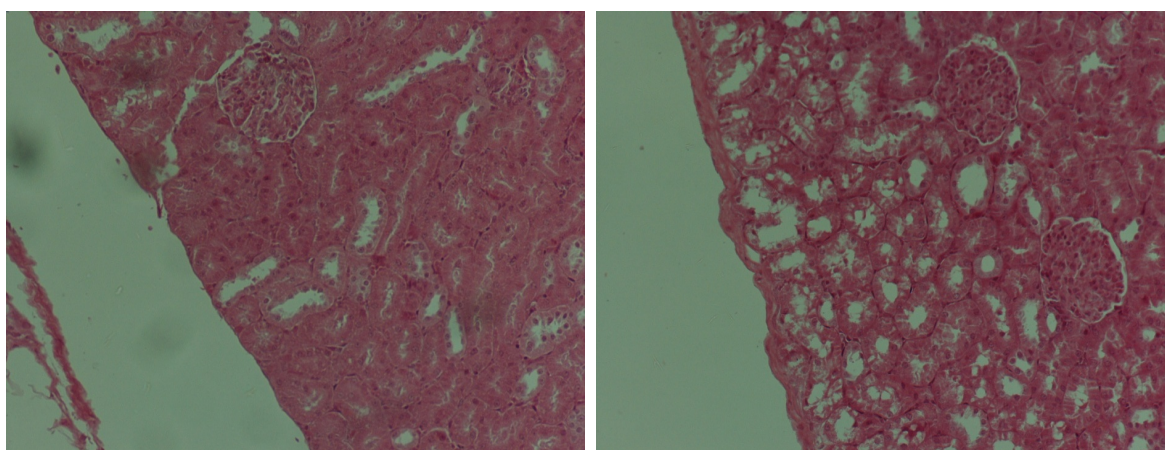
Εικόνα 26. Φυσιολογικός ιστός νεφρού επίμυων (Control)



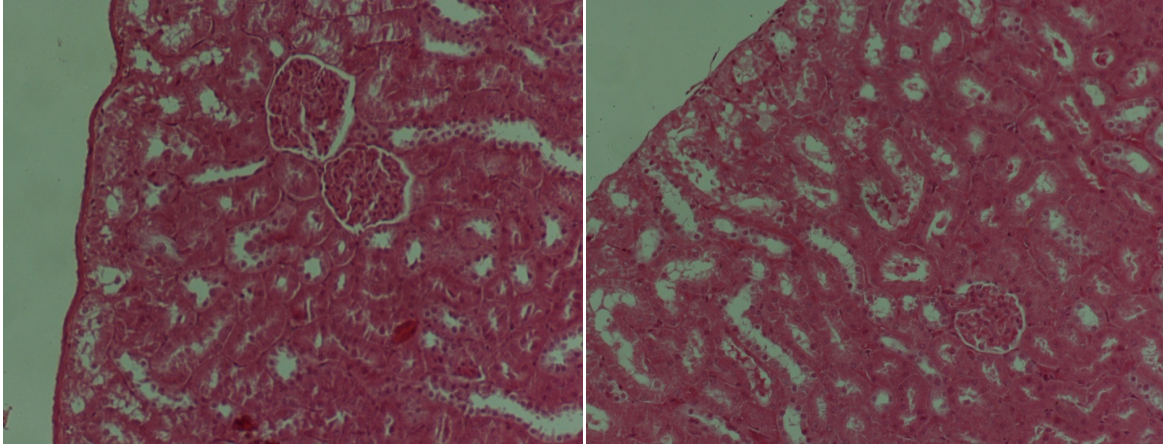
Εικόνα 27. Ιστός νεφρού μετά από χορήγηση δόσης κουρκουμίνης 16 mg/kg



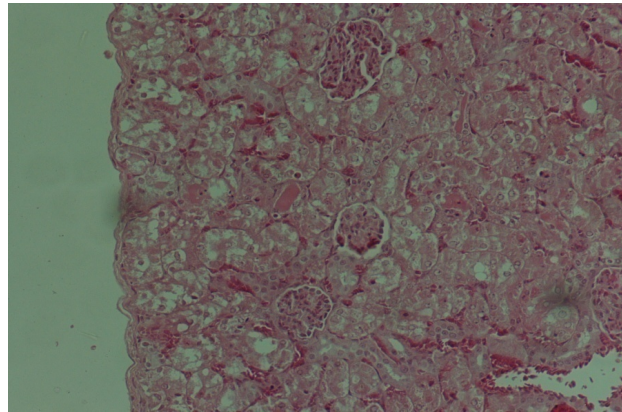
Εικόνα 28. Ιστός νεφρού μετά από χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg (πρώτη εικόνα) και 20mg/kg (δεύτερη εικόνα)



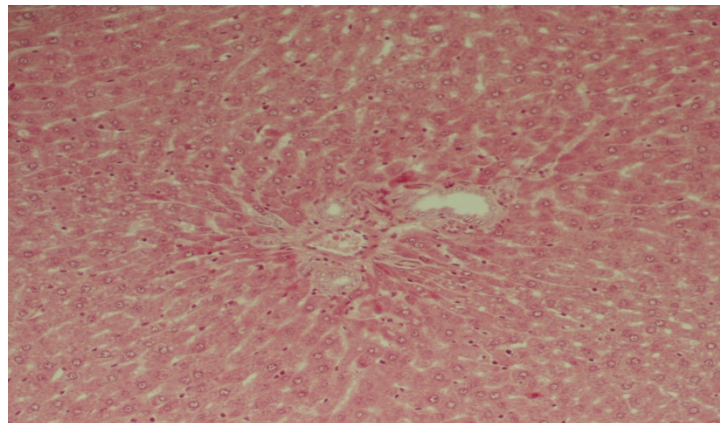
Εικόνα 29. Ιστός νεφρού μετά από χορήγηση 16mg/kg κουρκουμίνης και έπειτα χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg (πρώτη εικόνα) καθώς και χορήγηση σισπλατίνης 5mg/kg πρώτα και μετά χορήγηση κουρκουμίνης 16mg/kg(δεύτερη εικόνα)



Εικόνα 30. Χορήγηση 8mg/kg (πρώτη εικόνα), και 16mg/kg (δεύτερη εικόνα) κουρκουμίνης, πριν και μετά την δόση σισπλατίνης 5 mg/kg



Εικόνα 31. Χορήγηση 4mg/kg κουρκουμίνης, πριν και μετά την δόση σισπλατίνης 20 mg/kg



Εικόνα 32. Φυσιολογικός ιστός ήπατος επίμυων

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η σισπλατίνη προκαλεί πιο έντονη νεφροτοξικότητα παρά ηπατοτοξικότητα λόγω του ότι το φάρμακο παραμένει για μεγαλύτερο διάστημα στα νεφρικά σωληνάκια. Η ούσια κουρκουμίνη έδειξε ότι δεν είναι τοξική σε ιστοπαθολογικό επίπεδο. Επίσης η κουρκουμίνη προστατεύει τον νεφρό πειραματοζώων διότι ο νεφρός δεν επιβαρύνεται περαιτέρω από την τοξική δράση σισπλατίνης.

3.2.4 Στατιστική ανάλυση

Για το προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Με τη χρήση του ασύζευκτου t-test συγκρίθηκαν οι τιμές ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ή ανάμεσα στους χρόνους για την ίδια ομάδα. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές (5% πιθανότητα λάθους). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm σταθερή απόκλιση. Κάθε πείραμα διεξήχθη τουλάχιστον τρεις φορές και μόνο τα αποτελέσματα με υψηλή επαναληψιμότητα θεωρήθηκαν έγκυρα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φρούτα, τα λαχανικά και τα μπαχαρικά φαίνεται να παίζουν ρόλο στην προστασία έναντι ποικίλων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων και κακοήθων νεοπλασμάτων (κοινώς καρκίνος) (510, 511). Πάνω από 6 εκατομμύρια άτομα χάνουν την ζωή τους από τον καρκίνο κάθε χρόνο και η ασθένεια αυτή είναι η κύρια αιτία θανάτου στους άντρες και στις γυναίκες σε όλον τον κόσμο (294).

Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια πολλαπλή διαδικασία πολλών σταδίων, η οποία οδηγεί σε κλινικά εμφανείς και μεταστατικούς όγκους. Η καρκινογένεση είναι μια χρονοβόρα διαδικασία με καθορισμένα στάδια, που ονομάζονται έναρξη, προαγωγή και προώθηση. Επειδή οι μεταστατικοί καρκίνοι είναι κυρίως μη θεραπεύσιμοι, γίνεται προσπάθεια να παραταθεί ο χρόνος εξέλιξης ή να αποτραπεί πλήρως η διαδικασία της καρκινογένεσης μέσω της χημειοπροφύλαξης, η οποία αποτελεί μια σημαντική και εφικτή στρατηγική για τον έλεγχο και τη διαχείριση κακοήθων νεοπλασμάτων. Η ιδέα της χημειοπροφύλαξης είναι να ελέγχει με φυσικές ή συνθετικές ουσίες τον καρκίνο, μέσω της επιβράδυνσης, της παρεμπόδισης ή της αντιστροφής της ανάπτυξης της πάθησης. Έχουν αναφερθεί διάφοροι λόγοι, για τους οποίους οι φυσικές ουσίες προτιμώνται για την χημειοπροφύλαξη. Έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες, όπου κατά την διάρκεια χημειοθεραπείας, έχουν χορηγηθεί αντιοξειδωτικές ουσίες. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη 15 ασθενών, που λαμβάνουν χημειοθεραπεία για διάφορους τύπους προχωρημένου καρκίνου, παράλληλα με την χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, στους ασθενείς δόθηκε και β – καροτένιο. Παρατηρήθηκε ότι το β – καροτένιο ελάττωσε τις παρενέργειες(512).

Επίσης, σε μια τυχαία μελέτη 20 ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία, στους ασθενείς δόθηκε βιταμίνη E ημερησίως. Η βιταμίνη E αύξησε το ποσοστό απόκρισης στη θεραπεία και προλαμβάνει τη βλέννογονίτιδα (μια φλεγμονώδη απόκριση της στοματικής κοιλότητας, που προκαλείται από την ακτινοθεραπεία) (513). Σε 16 καρκινοπαθείς ασθενείς, που έλαβαν δοξορουβικίνη, δόθηκε βιταμίνη E για να προσδιοριστεί εάν η βιταμίνη E μπορεί να προσδώσει προστασία ενάντια στην αλωπεκία, που συμβαίνει σε όλους τους ασθενείς, στους οποίους χορηγείται δοξορουβικίνη. Ένα ποσοστό 69% των ασθενών, που έλαβαν δοξορουβικίνη και βιταμίνη E δεν είχαν αλωπεκία (514).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η δράση ορισμένων φυσικών ουσιών, όπως τα φλαβονοειδή επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, ρουτίνη και ναρινγίνη, και οι μη φλαβονοειδείς φυτοχημικές ουσίες, όπως το γαλλικό οξύ, η ρεσβερατρόλη και η κουρκουμίνη, που χορηγήθηκαν μόνες τους και σε συνδυασμό με την σισπλατίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η κουερσετίνη παρουσιάζει δόσο-εξαρτώμενη τοξική δράση στην LMS κυτταρική σειρά με την τιμή IC_{50} να υπολογίζεται στην συγκέντρωση $153 \pm 6.5 \mu M$ για 48ώρη επώαση. Η κουερσετίνη δεν εμφάνισε τοξική δράση στην κυτταρική σειρά H1299 με την τιμή IC_{50} να υπολογίζεται στην συγκέντρωση $1603 \pm 17.2 \mu M$ για 48ώρη επώαση. Φαίνεται να υπάρχει κάποια επιλεκτικότητα της κουερσετίνης προς τις νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές, έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Η τοξική δράση της κουερσετίνης, όμως, έχει περιγραφεί και από άλλες *in vitro* μελέτες. Η τοξική δόσο-εξαρτώμενη δράση της κουερσετίνης έχει περιγραφεί σε καρκινική σειρά του πνεύμονα και συγκεκριμένα στην σειρά A-549 με την τιμή IC_{50} να υπολογίζεται στην συγκέντρωση $1.41 \pm 0.15 \mu mol/L$ (515). Η αντικαρκινική δράση της κουερσετίνης έχει περιγραφεί και στο νευροβλάστωμα και συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά Neuro2a, όπου η κουερσετίνη εμφάνισε δόσο-εξαρτώμενη δράση με την τιμή IC_{50} να υπολογίζεται στην συγκέντρωση $40 \mu M$ για 24 ώρες επώαση με την κουερσετίνη (516). Επίσης, η κουερσετίνη εμφάνισε τοξική δόσο-εξαρτώμενη δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB468 (517) και στην κυτταρική σειρά HL-60 λευχαιμικά κύτταρα (518). Τα δικά μας αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και επεκτείνουν τα αποτελέσματα των προηγούμενων αναφορών.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει τις αντιοξειδωτικές και αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες του πράσινου τσαγιού και ειδικά της επιγαλοκατεχίνης. Όσον αφορά τα πειράματά μας, η επιγαλοκατεχίνη παρουσίασε δόσο-εξαρτώμενη τοξική δράση στις κυτταρικές σειρές LMS και H1299, με την τιμή IC_{50} να υπολογίζεται σε $208.9 \pm 15.5 \mu M$ και $184.7 \pm 31.7 \mu M$, αντίστοιχα, για 48ώρη επώαση με την επιγαλοκατεχίνη. Βιβλιογραφικά, έχει αναφερθεί η κυτταροτοξική δράση της επιγαλοκατεχίνης. Η επιγαλοκατεχίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό της ανθεκτικής στην χημειοθεραπεία κυτταρικής σειράς του παχέος εντέρου HT-29 (519). Η τοξική δράση της επιγαλοκατεχίνης έχει παρατηρηθεί και σε κυτταρικές σειρές των ωοθηκών και συγκεκριμένα στις κυτταρικές σειρές SKOV-3, OVCAR-3 κύτταρα, και PA-1 (520). Η δράση της επιγαλοκατεχίνης έχει

σημειωθεί και στον καρκίνο του προστάτη και συγκεκριμένα στις καρκινικές σειρές LNCaP, PC-3 και DU145

Το γαλλικό οξύ είναι μια τρι-υδροξυ-φαινολική ένωση, η οποία απαντάται διάφορα φυσικά προϊόντα, όπως το πράσινο τσάι, τα σταφύλια, τις φράουλες, τις μπανάνες και σε πολλά άλλα φρούτα (521). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το γαλλικό οξύ παρουσίασε τοξική δράση τόσο στην LMS κυτταρική σειρά όσο και στην H1299 κυτταρική σειρά με το IC_{50} να υπολογίζεται στα $46.5 \pm 11.5 \mu M$ και $51.6 \pm 18.4 \mu M$ αντίστοιχα. Η τοξική δράση του γαλλικού οξέος αποδεικνύεται και από άλλες μελέτες, όπως για παράδειγμα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του οισοφάγου. Όταν στην κυτταρική σειρά του οισοφάγου TE-2, χορηγήθηκαν $0,2 \text{ mg/ml}$ GA, παρατηρήθηκαν σαφείς μορφολογικές αλλαγές 12 ώρες μετά την αγωγή. Η θεραπεία με GA επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα TE-2 (522). Μετά από θεραπεία με γαλλικό οξύ για 24 ώρες, παρατηρήθηκε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων γλοιώματος U87 και U251n, όπως παρατηρήθηκε με τη μέθοδο του MTT (523). Μετά από έκθεση σε GA για 24 ώρες, η ανάπτυξη κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa) μειώθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, με την τιμή IC_{50} περίπου σε $80 \mu M$ (524).

Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη αρκετών καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπου, όπως και σε ζωικά μοντέλα καρκινογένεσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η ρεσβερατρόλη παρουσίασε την τιμή IC_{50} στην συγκέντρωση $57.4 \pm 8.4 \mu M$ για τα LMS κύτταρα και στην κυτταρική σειρά H1299 η τιμή IC_{50} ήταν $50.5 \pm 15.3 \mu M$. Η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί σε πολλές κυτταρικές σειρές, όπως σε πλακώδη HCE7 κύτταρα καρκίνου του οισοφάγου, σε Bic-1 και Seg-1 αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου, σε SW480 κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, σε MCF7 κύτταρα καρκίνου του μαστού και στη λευχαιμική κυτταρική σειρά HL60. Στις κυτταρικές σειρές Seg-1, HCE7, SW480, MCF7 και HL60 η τιμή IC_{50} της ρεσβερατρόλης υπολογίστηκε σε συγκεντρώσεις από 70-150 μM (525).

Όσον αφορά τη ναρινγίνη, δεν παρουσίασε τοξικότητα στις καρκινικές σειρές των LMS και H1299 κυττάρων, καθώς παρουσίασε πολύ υψηλές τιμές IC_{50} ($1500 \pm 24.4 \mu M$ και $767.4 \pm 10.3 \mu M$ αντίστοιχα). Ίδια εικόνα με την ναρινγίνη παρουσιάζει και η ρουτίνη. Η ρουτίνη παρουσιάζει πολύ υψηλή τιμή IC_{50} , αφού μετρήθηκε στα $1993 \pm 27.3 \mu M$ στα LMS κύτταρα και $1508 \pm 19.7 \mu M$ στα H1299 κύτταρα, αντίστοιχα. Βιβλιογραφικά, η ναρινγίνη

και η ρουτίνα παρουσιάζουν τοξικότητα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και στις κυτταρικές σειρές HT-29 and Caco-2 (152).

Όσον αφορά την ουσία κουρκουμίνη, αυτή παρατηρήθηκε να είναι η πιο δραστική ουσία και στις δυο κυτταρικές σειρές των LMS και την H1299 κυττάρων, σύμφωνα με τις μετρήσεις μας. Η τιμή IC_{50} για τα LMS κύτταρα υπολογίστηκε στα $27.3 \pm 5.5 \mu M$ για 48ώρη επώαση σε συγκεντρώσεις από $3.9 \mu M$ - $250 \mu M$ κουρκουμίνης και για τα κύτταρα H1299 η τιμή IC_{50} υπολογίστηκε στα $26 \pm 4 \mu M$ με χρήση των ίδιων συγκεντρώσεων της ουσίας. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, έχει αναφερθεί ότι η κουρκουμίνη μείωσε σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων HT-29 και HCT-15 (κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου) (526). Επίσης η κουρκουμίνη επέδειξε μία αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου), SW620 (καρκίνος του παχέος εντέρου), MCF-7 (καρκίνος του μαστού), Hep 3B (ηπατοκαρκίνωμα) και των K562 και HL-60 λευχαιμικών κυττάρων(527).

Συμπερασματικά, σύμφωνα και με τα δικά μας αποτελέσματα, αλλά και τις βιβλιογραφικές πηγές, φαίνεται ότι οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν κάποια επιλεκτικότητα σχετικά με την τοξικότητα που προκαλούν στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Βέβαια, τα μόρια αυτά δεν παρουσιάζουν την ίδια δράση μεταξύ τους και οι τιμές IC_{50} διαφέρουν σημαντικά.

Παρατηρώντας, τα αποτελέσματα χορήγησης ουσιών στην φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών (MRC-5), συμπεραίνεται ότι οι ουσίες προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού στα φυσιολογικά κύτταρα μόνο σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Συνολικά, οι ενώσεις, που μελετήθηκαν, φαίνεται να παρουσιάζουν εξειδικευμένη τοξικότητα στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, χωρίς να επηρεάζεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών ινοβλαστών. Το δεδομένο αυτό είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικό για την μελέτη του μηχανισμού εκλεκτικής δράσης της κουρκουμίνης σε κύτταρα κακοήθη, εν συγκρίσει με κύτταρα φυσιολογικά. Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι η κουρκουμίνη αντιπροσωπεύει μια ουσία η οποία απαντά ως συστατικό ενός τροφίμου (μπαχαρικού) της μεσογειακής και ανατολικής διατροφής, πράγμα που υποδεικνύει ότι το εν λόγω μπαχαρικό έχει χαρακτήρα ενός τροφίμου προστατευτικού για την υγεία του ανθρώπου και ενδεχομένως θεραπευτικού για την κακοήθη

νεοπλασματική νόσο. Είναι πολύ πιθανό ότι στον κουρκουμά (turmeric) να υπάρχουν εκτός από την κουρκουμίνη και άλλες συγγενείς προς αυτήν ουσίες οι οποίες να έχουν ανάλογες ιδιότητες, δηλαδή εκλεκτική αντικαρκινική δράση. Είναι ενδιαφέρον να ελεγχθεί επιμελώς η αντιοξειδωτική ικανότητα της κουρκουμίνης και να συσχετιστεί το κατά πόσον αυτή σχετίζεται θετικά - και μέσω ποιών οδών - με τις αντινεοπλασματικές της ιδιότητες.

Η σισπλατίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο, που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία πολλών κακοηθειών, που περιλαμβάνουν τον καρκίνο των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστης, τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του εγκεφάλου, του οισοφάγου, καθώς και το μη μικροκυτταρικό και το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (406). Η σισπλατίνη προκαλεί δύο διαφορετικούς τρόπους κυτταρικού θανάτου, τη νέκρωση και την απόπτωση. Η βλάβη στο DNA, που προκαλείται από τη σισπλατίνη, σταματά τον κυτταρικό κύκλο, αναστέλλει τη μεταγραφή και εκκινεί την απόπτωση. Υπερβολική βλάβη στο DNA επάγει την υπερέκφραση της πόλη(ADP-ριβόζη)πολυμεράσης (PARP), που μπορεί να προκαλέσει ελάττωση του NAD^+ /ATP. Εάν η ελάττωση του ATP φτάνει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, παρατηρείται νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος (528). Εκτός από τη μεγάλη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία κατά του καρκίνου, η σισπλατίνη, η καρβοπλατίνη και άλλα παράγωγα της σισπλατίνης, στην κλινική εφαρμογή τους εμφανίζονται και αρνητικές επιπτώσεις, όπως οι παρενέργειες και η απόκτηση ανθεκτικότητας σε αυτά τα φάρμακα, πράγμα το οποίο υπονομεύει τη θεραπευτική τους δυναμική (529). Τα μειονεκτήματα αυτά είναι κρίσιμης σημασίας για την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των εν λόγω ενώσεων και αποτελούν, τρόπον τινά, την «αχίλλεια πτέρνα» τους από πλευράς θεραπευτικής. Η υψηλή τοξικότητα της σισπλατίνης προκαλεί κυρίως νεφροτοξικότητα (530). Ένα ενεργοποιημένο μόριο σισπλατίνης, το οποίο, από πλευράς χημικής συμπεριφοράς είναι ηλεκτρόφιλο, προκαλεί διάφορες παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες (531, 532). Δεν έχει όμως αποσαφηνιστεί αν ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης του εν λόγω μορίου αντιπροσωπεύεται αποκλειστικά από την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κακοήθη κύτταρα, ή όχι. Είναι πιθανό ότι η αμιγής αντικαρκινική δράση διαφορίζεται από το επαγόμενο οξειδωτικό στρες. Οπότε το τελευταίο αυτό ως φαινόμενο είναι

ανεπιθύμητο και καταστροφικό, κυρίως δε για τα υγιή κύτταρα. Συνεπώς η αντιμετώπισή του είναι πολύ σημαντική κατά την διάρκεια της χημειοθεραπευτικής παρέμβασης αλλά και μετά. Από τη στιγμή που τα φυτοχημικά χαρακτηρίζονται από ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μια νέα προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου θα μπορούσε να συνδυάσει τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα με τα φυτοχημικά μόρια.

Οι φαινολικές ενώσεις από την πλευρά τους εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που σχετίζονται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί της χημειοπροστασίας από τις πολυφαινόλες ποικίλουν και περιλαμβάνουν την αναστολή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 και του Nf-κB. Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να παρεμβαίνουν σε αυτό το μονοπάτι, είναι η ρεσβερατρόλη και η επιγαλλοκατεχίνη (EGCG). Εκτός από τον προαναφερθέντα μηχανισμό, στη δράση των φαινολικών ενώσεων συμπεριλαμβάνεται και η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση, η ικανότητα πρόκλησης απόπτωσης, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή του μονοπατιού του υποδοχέα αύξησης GFR, η αναστολή της αγγειογένεσης, η αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών κ.α. (533).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προεπάση των δυο κυτταρικών σειρών (LMS και H1299) με τα φυτοχημικά. Μετά από 24 ώρες επώαση με τα φυτοχημικά, έγινε προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (1.25-80μM για τα LMS κύτταρα και 7.8-250 μM για την κυτταρική σειρά H1299). Η τιμή IC₅₀ για τη σισπλατίνη στην LMS κυτταρική σειρά υπολογίστηκε στην συγκέντρωση 8.6±1.1μM, ενώ στην κυτταρική σειρά H1299 υπολογίστηκε στη συγκέντρωση 43.0±6.8μM για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις της σισπλατίνης. Στην περίπτωση των LMS κυττάρων, η προεπάση με την κουερσετίνη, την επιγαλλοκατεχίνη, το γαλλικό οξύ και την κουρκουμίνη, παρατηρήθηκε ενίσχυση στη δράση της σισπλατίνης. Στην περίπτωση των H1299 κυττάρων, όλες οι ουσίες ενίσχυσαν τη δράση της σισπλατίνης.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλαβονοειδή, όπως η κουερσετίνη και η λουτεολίνη, ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα, που προκαλείται από τη σισπλατίνη σε L1210 κύτταρα (κυτταρική σειρά λευχαιμίας ποντικού) (534). Η θετική επίδραση των φλαβονοειδών στην αποτελεσματικότητα της σισπλατίνης μπορεί να εξαρτάται από την

παρουσία του υδροξυλίου στις θέσεις 3' και 4' του Β-δακτυλίου. Οι μοριακοί μηχανισμοί των φλαβονοειδών, που εμπλέκονται στην αποτελεσματικότητα της σισπλατίνης παραμένουν άγνωστοι, αλλά η επαγωγή της κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης από τα φλαβονοειδή μπορεί να περιλαμβάνει την υπερρύθμιση κάποιων βημάτων στο αποπτωτικό μονοπάτι σηματοδότησης από τα φλαβονοειδή (535). Σύμφωνα με μία μελέτη (536), η προσθήκη 5μg σισπλατίνης και 50μg κουερσετίνης, όπως και η προσθήκη 105μg σισπλατίνης και 50μg κουερσετίνης, μείωσε τον πολλαπλασιασμό των SPC212 κυττάρων (536), συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου, και μετά από προσθήκη ξεχωριστά σισπλατίνης και κουερσετίνης. Έχει αναφερθεί ότι η κουερσετίνη αναστέλλει την ανάπτυξη κάποιων καρκινικών κυττάρων, όπου η αντι-πολλαπλασιαστική δράση τους μεσολαβείται από θέσεις πρόσδεσης οιστρογόνου τύπου II (Type II EBS) (537, 538). Προτείνεται ότι η κουερσετίνη μπορεί να έχει συνεργατική δράση με την σισπλατίνη, αλληλεπιδρώντας με αυτές τις θέσεις δέσμησης (164, 506).

Η αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης, μόνη της ή σε συνδυασμό με την σισπλατίνη, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (κυτταρική σειρά HA22T/VGH) ερευνήθηκε από μία άλλη ερευνητική ομάδα (539). Ο συνδυασμός της κουρκουμίνης και της σισπλατίνης εξασκεί συνεργατική κυτταροτοξική δράση. Ο συνδυασμός αυτός έχει ως αποτελέσματα τη μείωση στην έκφραση των διαφορετικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των c-myc, Bcl-XL, c-IAP-2, NAIP και XIAP (539). Η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 20 μM ενισχύει την κυτταροτοξική δράση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου οξαλιπλάτινη στην καρκινική κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου HCT116, καθώς και μετά από αποσιώπηση της p53 και της p21 στα ίδια κύτταρα (540).

Προεπάση των καρκινικών κυτταρικών σειρών των ωθηκών CAOV3, SKOV3 και C200 με επιγαλοκατεχίνη, αύξησε την τοξικότητα της σισπλατίνης σε αυτές τις τρεις κυτταρικές σειρές. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η EGCG μπορεί να επιτείνει το οξειδωτικό στρες, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων των ωθηκών και τα ευαισθητοποιεί στη σισπλατίνη (541). Στις κυτταρικές σειρές 1321N1 και U87-MG (κυτταρικές σειρές γλοιώματος), μετά από θεραπεία με συνδυασμό σισπλατίνης και EGCG, παρατηρήθηκε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα, που δεν έγινε προσθήκη EGCG. Ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και όταν αντί για τη σισπλατίνη γίνεται προσθήκη ταμοξιφένης. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να

εξηγηθεί με το μηχανισμό της καταστολής της τελομεράσης από την επιγαλοκατεχίνη, ο οποίος στη συνέχεια, οδηγεί σε απόπτωση. Η αναστολή της τελομεράσης οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων σε φάρμακα, όπως η σισπλατίνη και η ταμοξιφένη και οι τελομεράσες σχετίζονται με την χημειοευαισθησία σε διάφορα καρκινικά κύτταρα(542).

Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα, παρατηρήθηκε πως ο τρόπος κυτταρικού θανάτου, που επάγεται μετά τη χορήγηση σισπλατίνης, είναι μέσω της αποπτωτικής διαδικασίας. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι προεπάση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, γαλλικό οξύ και κουρκουμίνη, αύξησε επιπλέον την απόπτωση των κυττάρων, συγκριτικά με τη σισπλατίνη (μόνη της). Η προεπάση με ναρινγίνη δεν έφερε κάποια αλλαγή στην απόπτωση, συγκριτικά με αυτή, που μετρήθηκε μετά από τη χορήγηση μόνο της σισπλατίνης. Η κουρκουμίνη ήταν η ουσία, που κατόπιν προεπάσης των LMS κυττάρων με αυτή, προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση στην απόπτωση, συγκριτικά με την απόπτωση, που προκαλεί η χορήγηση της σισπλατίνης από μόνης της και συγκεκριμένα σε ποσοστό 16%.

Τα περισσότερα, αν όχι όλα τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση σε απόκριση σε αντικαρκινικά φάρμακα και έχει αναφερθεί ότι υπάρχει ένα "οριακό επίπεδο" της κυτταρικής βλάβης, μετά από το οποίο ενεργοποιείται η απόπτωση. Αυτό το «όριο» εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων, που εκτίθενται στο φάρμακο (543). Η αύξηση στην απόπτωση από τις φυτοχημικές ουσίες συγκριτικά με τη χημειοθεραπευτική ουσία έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες. Ο συνδυασμός κουερσετίνης και σισπλατίνης έχει την ικανότητα να αυξήσει την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων HL-60 και L1210, που προκαλείται από την σισπλατίνη (534). Ο ακριβής μηχανισμός για το πώς η κουερσετίνη παρεμβαίνει στη θεραπεία με τη σισπλατίνη είναι ασαφής. Ο Jakubowicz-Gil, το 2005 έδειξε ότι η προεπάση κυττάρων με κουερσετίνη, που ακολουθείται από προσθήκη σισπλατίνης, ήταν πολύ αποτελεσματική στην επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa (544). Είναι γνωστό ότι η κουερσετίνη μπορεί να επάγει την απόπτωση κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Η προ-αποπτωτική δράση της κουερσετίνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, την αναστολή της έκφρασης και την πυρηνική μετατόπιση της Hsp72 καθώς

επίσεις και την μείωση των επιπέδων της MRP (multidrug resistance protein). Βέβαια, ο ρόλος της κουερσετίνης είναι αντικρουόμενος γιατί μπορεί να ενεργεί ως αντιοξειδωτικό και ως οξειδωτικό (αύξηση της παραγωγής ROS). Η συμπεριφορά της, εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, τη συγκέντρωση και την πηγή των ελευθέρων ριζών (545, 546).

Ο συνδυασμός επιγαλοκατεχίνης (5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$) με τη σισπλατίνη (10 $\mu\text{g/ml}$) επάγει τη μεγαλύτερη απόπτωση σε κύτταρα τραχήλου της μήτρας συγκριτικά με τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά. Η συνδυαστική θεραπεία, η οποία ενισχύει την απόπτωση, σχετίζεται με την υπερρύθμιση της p53 και της Bax και την υπορρύθμιση της πρωτεΐνης Bcl-2. Μεταξύ των ρυθμιστών της απόπτωσης, η p53 είναι ένα σημαντικό μόριο, το οποίο συμμετέχει στην απόπτωση μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (547) και η Bax ενεργοποιείται σε έναν αριθμό συστημάτων κατά τη διάρκεια της απόπτωσης από την p53 (548).

Προ-επώαση των HepG2 κυττάρων με την κουρκουμίνη για 24 ώρες πριν από την προσθήκη της σισπλατίνης αυξάνει την Bax και την πυρηνική απόπτωση, που επάγουν τον παράγοντα AIF (παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης) και μειώνει την έκφραση του Bcl-XL. Κατά συνέπεια, η απόπτωση που προκαλείται από τη σισπλατίνη αυξάνεται κατά 16,3% μετά από την προεπώαση των κυττάρων με κουρκουμίνη (549).

Στην δικιά μας έρευνα, η χορήγηση σισπλατίνης στην τιμή της IC_{50} (8,6 μM), έδειξε να σταματά τον κυτταρικό κύκλο στην S φάση. Η προεπώαση των LMS κυττάρων με τα φυτοχημικά ναρινγίνη, γαλλικό οξύ, επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη και κουρκουμίνη μείωσε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση και παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα παραμένουν στην φάση ανάπτυξης (G0/G1). Στην αγρίου τύπου κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνωμα ωοθηκών, μετά από 48 ώρες επώαση με κουρκουμίνη και σισπλατίνη, αυξήθηκε η αναστολή στην sub-G0 φάση του κυτταρικού κύκλου (+ 175%) όπως και επίσης στην G0/G1 φάση (+ 35%), ενώ μειώθηκε η αναστολή στην G2/M φάση (-60%) σε σύγκριση μόνο με τη σισπλατίνη. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η ταυτόχρονη θεραπεία με κουρκουμίνη και σισπλατίνη, καθιστά τα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών πιο ευαίσθητα στη δράση των φαρμάκων πλατίνας (550). Σε μια άλλη μελέτη προτείνεται ότι η αντιφλεγμονώδης και αποπτωτική δράση της

κουρκουμίνης θα μπορούσε να μεσολαβεί στη ρύθμιση της κατάστασης οξειδοαναγωγής των καρκινικών κυττάρων (551).

Στην λευχαιμική κυτταρική σειρά L1210 έγινε παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και στην G2/M φάση από τη σισπλατίνη. Η χορήγηση της σισπλατίνης σε συνδυασμό με την κουερσετίνη είχε μικρή δράση στον κυτταρικό κύκλο, παρόλο που έφερε μια σημαντική αύξηση στην φάση sub-G0.

Πολλοί κυτταρικοί παράμετροι, που είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο ελέγχονται από τα μιτοχόνδρια. Αυτές περιλαμβάνουν τον έλεγχο της παραγωγής ενέργειας, τη ρύθμιση των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), τον έλεγχο των επιπέδων του κυτοσολικού ασβεστίου (Ca^{2+}), τη συμβολή στην κυτοσολική βιοσύνθεση προδρόμων μορίων, όπως το ακετυλο-CoA και τις πυριμιδίνες, και την έναρξη της απόπτωσης, μέσω της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mtPTP). Αλλαγές σε αυτές τις παραμέτρους μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στα βιοσυνθετικά μονοπάτια, στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του κυττάρου, στους μεταγραφικούς παράγοντες και στη χρωματίνη. Τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των μιτοχονδρίων, που οδηγεί σε ανεπάρκεια μιτοχονδριακής αναπνοής και την παραγωγή ATP (552, 553).

Η μιτοχονδριακή βλάβη έχει αναγνωριστεί ως μία από τις παρενέργειες πολλών φαρμάκων και τοξινών, λόγω του κεντρικού ρόλου των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια μπορεί να είναι ένας άμεσος και σημαντικός στόχος της σισπλατίνης και των αναλόγων της. Η σισπλατίνη προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη, όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη ρευστότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (554). Μελέτες σχετικά με τη σισπλατίνη και τη μιτοχονδριακή βλάβη έχουν αποδείξει ότι αυξάνουν την ακαμψία της μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σισπλατίνη προκαλεί διαταραχή στην αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και των επιπέδων λιπιδίων-πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Μία μελέτη (555) έδειξε ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, που προκαλείται από τη σισπλατίνη προκαλείται από την αναστολή των συμπλοκών I έως IV της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία οδηγεί σε μειωμένα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ATP. Αυτή η επιλεκτικότητα για τα μιτοχόνδρια πιθανόν να προκαλείται από τη συσσώρευση της σισπλατίνης στον αρνητικά φορτισμένο εσωτερικό χώρο των μιτοχονδρίων λόγω του

θετικού φορτίου των συμπλόκων της σισπλατίνης. Πράγματι έχει αναφερθεί ότι η σισπλατίνη συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του νεφρού *in vitro*. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, ο συνδυασμός φλαβονοειδών και σισπλατίνης ενισχύει τη δράση της σισπλατίνης και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κατά την προεπάση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη και κουερσετίνη, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ενίσχυση στη δράση της σισπλατίνης, ενώ η προεπάση των κυττάρων με ναρινγίνη επιφέρει μικρότερη αύξηση στη δράση της σισπλατίνης.

Όσον αφορά τα *in vivo* αποτελέσματα μας και συγκεκριμένα τα επίπεδα της MDA (μηλονικής διαλδεΐδης) στα ούρα των πειραματοζώων, παρατηρήθηκε ότι η κουρκουμίνη στη δόση των 4 mg/kg και 8 mg/kg, μείωσε τα επίπεδα της MDA (μηλονικής διαλδεΐδης) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα, όπου χορηγήθηκαν 16 mg/kg κουρκουμίνης, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της MDA, πράγμα το οποίο, πιθανώς, υποδηλώνει ότι η δόση αυτή είναι πολύ μεγάλη και ότι είναι δυνατόν να προκαλέσει φαινόμενα πυροδότησης υπεροξειδωσής λιπιδίων σε πολλές ιστικές δομές του σώματος των πειραματοζώων. Είναι πολύ πιθανόν η αύξηση των επιπέδων της μηλονικής διαλδεΐδης να σχετίζεται 1^{ov}) με τον μεταβολισμό αυτής σε συστήματα όπως το κυτόχρωμο P-450 και 2^{ov}) με ισχυροποίηση της έντασης λειτουργίας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθόσον η αντιφλεγμονώδης δράση της κουρκουμίνης ίσως αφορά μόνο ένα από τα δύο κρίσιμης σημασίας ένζυμα της αραχιδονικής οδού (κυκλοξυγονάση και λιποξυγονάση), οπότε αν συμπιεστεί η λειτουργία του ενός ενισχύεται η ροή των αραχιδονικών μεταβολιτών από το άλλο ένζυμο και συνεπώς η αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών με συνέπεια την αυξημένη λιποϋπεροξειδωσής. 3^{ov}) Επίσης είναι πιθανή και η εντατικοποίηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια των ιστών των ζώων με την παρουσία της κουρκουμίνης. Ο έλεγχος αυτών των υποθέσεων είναι αντικείμενο μεταδιδακτορικής έρευνας εκ μέρους μας. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η σισπλατίνη, έστω και στη μικρή δόση των 5 mg/kg, αυξάνει τα επίπεδα της MDA σχεδόν στο διπλάσιο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αύξηση στα επίπεδα υπεροξειδωσής των λιπιδίων μετά από χορήγηση σισπλατίνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε αρσενικούς Wistar αρουραίους με βάρος 200 ± 10 g (556, 557). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η σισπλατίνη προκαλεί υπεροξειδωσής των

λιπιδίων στα νεφρά μέσω της παραγωγής ROS (558). Στην μελέτη μας, στην περίπτωση, όπου έγινε πρώτα χορήγηση κουρκουμίνης και μετά σισπλατίνης, όπως και στην περίπτωση, κατά την οποία χορηγήθηκε αρχικά η σισπλατίνη και κατόπιν η κουρκουμίνη, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της MDA. Ίσως, η βλάβη, που έχει προκαλέσει η σισπλατίνη δεν μπορεί να είναι αναστρέψιμη σε καμία από τις δυο ομάδες. Το αποτέλεσμα ότι η προεπώαση με κουρκουμίνη δεν έφερε μείωση στα επίπεδα της MDA αναφέρεται και βιβλιογραφικά (556). Στην περίπτωση, όμως, όπου η χορήγηση της κουρκουμίνης, στις δόσεις των 4 mg/kg και 8 mg/kg, προηγήθηκε της χορήγησης της σισπλατίνης, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της MDA, σε σχέση με τη μείωση, που προκαλεί από μόνη της η σισπλατίνη. Η χορήγηση κουρκουμίνης, στις δόσεις των 4 mg/kg και 8mg/kg, πριν και μετά τη χορήγηση σισπλατίνης, αποδείχτηκε να είναι πιο αποτελεσματική και επιφέρει μείωση στα αυξημένα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA), που είχε προκαλέσει το φάρμακο. Όσον αφορά τη μεγάλη δόση της, στην ομάδα πειραματοζώων, στα οποία χορηγήθηκαν 16 mg/kg κουρκουμίνη και 20 mg/kg σισπλατίνη, παρατηρήθηκε μείωση της MDA. Είναι πολύ πιθανόν σε αυτή την περίπτωση η κουρκουμίνη να καταναλίσκεται εν πρώτοις για να αντιμετωπίσει την λιποϋπεροξειδωση που προκαλεί η σισπλατίνη, η οποία ποσοτικά είναι πολύ υψηλή. Συνεπώς ο μεταβολισμός της κουρκουμίνης μέσω κυτοχρώμου P-450 να προκύπτει ελαττωμένος και συνεπώς έτσι να ελαττώνονται και τα επίπεδα παραγωγής υπεροξειδίων και μηλονικής διαλδεΐδης τα εξαρτώμενα από τον καταβολισμό του εν λόγω αντιοξειδωτικού. Η ομάδα, στην οποία χορηγήθηκαν αρχικά 4mg/kg κουρκουμίνη, κατόπιν 20 mg/kg σισπλατίνη και τέλος, πάλι, μία δόση 4 mg/kg κουρκουμίνης, ήταν η μόνη ομάδα, που επιβίωσε μετά την προσθήκη της μεγάλης δόσης σισπλατίνης και παρατηρήθηκε και μείωση στα επίπεδα της MDA συγκριτικά με την ομάδα των ζώων, στην οποία χορηγήθηκε μόνο σισπλατίνη. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η προχορήγηση της κουρκουμίνης σε μικρές δόσεις διαμορφώνει ένα μεταβολικό μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό των ιστών στο οποίο ο τοξικός μεταβολισμός της σισπλατίνης γίνεται ηπιώτερος, αλλά δεν αναστέλλεται παρά παρατείνεται. Αυτό δηλώνει επίσης ότι η προχορήγηση της κουρκουμίνης πρέπει να προκαλεί μια επιβράδυνση της λειτουργίας συστημάτων, όπως το κυτόχρωμο P-450 (και των εν γένει κυτοχρωμάτων, π.χ των μιτοχονδρίων της αναπνευστικής αλυσίδας), οπότε η κινητική του καταβολισμού (άρα

και της ενεργοποίησης της σισπλατίνης) να είναι περισσότερο βραδεία αλλά όχι καταργημένη. Απλώς να παρατείνεται στον χρόνο. Η μεταχορήγηση της κουρκουμίνης κατόπιν της χορήγησης της μεγάλης δόσεως της σισπλατίνης φαίνεται να εξομαλύνει τις παρενέργειες του συγκεκριμένου αντικαρκινικού φαρμάκου επιμηκύνοντας τον καταβολισμό λόγω της παρέμβασης του ίδιου μηχανισμού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πολλές οξειδωτικές πρωτεΐνες στις οποίες εμπεριέχονται τα κυτοχρώματα τύπου P-450, τα μιτοχονδριακά κυτοχρώματα, αλλά και οι κυκλοξυγονάσες είναι χημικώς ανάλογης λειτουργικότητας και δομικά περιλαμβάνουν αιμικούς δακτυλίους με σίδηρο στο κέντρο τους. Είναι πολύ πιθανόν ότι όλες οι δράσεις της κουρκουμίνης να σχετίζονται με μια εισαγωγή του μορίου της στον αιμικό δακτύλιο των εν λόγω κυτοχρωμικών πρωτεϊνών και μια παρεμπόδιση της δραστηριότητάς τους, η οποία ωστόσο είναι μικρή και αναστρέψιμη και όχι καταστρεπτική και αναντίστρεπτη όπως αυτή της ασπιρίνης και εν γένει των σαλικυλικών. Τα επιχειρήματα αυτά ενισχύονται από την ακόλουθη δημοσίευση. Ο Rukkumani και οι συνεργάτες του το 2003, ανέφεραν την προστατευτική επίδραση της κουρκουμίνης ενάντια στα λιπίδια του αίματος και τη λιπιδική υπεροξείδωση. Επίσης έχειδειχτεί ότι η κουρκουμίνη εξασθενεί την οξειδωτική βλάβη του DNA στην επιδερμίδα ποντικού (559) και σε καλλιεργημένα κύτταρα ινοβλαστών ποντικού(560). Υπό αυτή την έννοια μπορεί να προβλέψει κανείς ότι η κουρκουμίνη πρέπει να έχει και αντιαιμοπεταλιακές αλλά πιθανών και αντιαθηρωματικές ιδιότητες ως προστατευτικός παράγων υπεροξείδωσης των λιποπρωτεϊνών τύπου LDL και ταυτοχρόνως ως αντιφλεγμονώδες μόριο.

Όσον αφορά την μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο πλάσμα επίμυων των πειραμάτων μας, το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη προκάλεσε μείωση στη δραστηριότητα της SOD, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, και στις δυο δόσεις, που χρησιμοποιήθηκε. Η σισπλατίνη έχειδειχτεί και στη βιβλιογραφία ότι μπορεί να μειώσει τα επίπεδα και τη διαθεσιμότητα των ενδογενών δεσμευτών των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) (557). Η μείωση αυτή μπορεί να προκύψει από οξειδωτική εξάντληση της γενετικής παρακαταθήκης του εν λόγω ενζύμου, από ισχυρό οξειδωτικό stress μέσω χορήγησης όζοντος με πιθανό μειορυθμιστικό μηχανισμό (561). Κατά τη χορήγηση κουρκουμίνης στις δόσεις των 4 mg/kg, 8 mg/kg και 16 mg/kg βάρους σώματος, η δραστηριότητα του ενζύμου αυξήθηκε σε μη στατιστικά

σημαντικά επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση κουρκουμίνης στα σχήματα συνδυασμού με το χημειοθεραπευτικό, αύξησε τη δραστηριότητα της SOD σε όλους τους συνδυασμούς και σε όλες τις δόσεις, που χρησιμοποιήθηκαν. Συνεπώς εδώ φαίνεται ότι η κουρκουμίνη είναι επαγωγέας του προστατευτικού αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD και προκαλεί αυξορύθμιση της έκφρασής του. Μία άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η χορήγηση κουρκουμίνης πριν τη θεραπεία με σισπλατίνη, σε αρσενικούς Wistar αρουραίους, αύξησε τα επίπεδα της SOD και της καταλάσης σε σύγκριση με την ομάδα σισπλατίνης. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η κουρκουμίνη δρα ως αντιοξειδωτικό για να «καθαρίσει» τις ROS, με αποτέλεσμα την αναστολή του οξειδωτικού στρες (562).

Σχετικά με το αντιοξειδωτικό ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), από τα αποτελέσματα μας παρατηρήθηκε ότι η σισπλατίνη και στις δυο δόσεις, που χρησιμοποιήθηκε, επέφερε μείωση στη δραστηριότητα του ενζύμου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση σισπλατίνης μείωσε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) (563, 564). Όλες οι δόσεις και τα σχήματα χορήγησης της κουρκουμίνης αύξησαν τη δραστηριότητα της GPx, αλλά η αύξηση, που παρατηρήθηκε στις δόσεις 8 mg/kg και 16 mg/kg πριν τη χορήγηση σισπλατίνης δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι η δραστηριότητα της GSH-Px και GSH σε ιστούς των όρχεων αρουραίων, στους οποίους έχει γίνει χορήγηση σισπλατίνης, είναι σημαντικά χαμηλή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η θεραπεία με κουρκουμίνη σε συνδυασμό με την σισπλατίνη αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της GSH-Px και τα επίπεδα της GSH (565).

Μετά τη χορήγηση σχημάτων συνδυασμού κουρκουμίνης και σισπλατίνης και την πραγματοποίηση εξετάσεων γενικής αίματος στους επίμυες, παρατηρήσαμε ότι η σισπλατίνη στην δόση των 5mg/kg, προκάλεσε μείωση στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αύξηση στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και τον αριθμό των αιμοπεταλίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι όταν πριν από τη σισπλατίνη χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης (16 mg/kg), υπάρχει μια αποκατάσταση στους αιματολογικούς δείκτες. Όταν χορηγήθηκε η μεγάλη δόση σισπλατίνης των 20mg/kg, τα περισσότερα πειραματόζωα κατέληξαν, καθώς η δόση αυτή ήταν πολύ τοξική. Οι επίμυες σε αυτήν την περίπτωση, παρουσίασαν και μειωμένη κινητικότητα υποδεικνύοντας κεντρική καταστολή.

Όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες, η σισπλατίνη προκαλεί μείωση σε όλους τους δείκτες, που αποτελούν ενδείξεις για βλάβες στα νεφρά και στο ήπαρ. Σύμφωνα με τις εξετάσεις της γενικής αίματος των επίμυων στην περίπτωση, όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη πριν και μετά τη δόση σισπλατίνης, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση, όπου χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης των 16mg/kg, υπάρχει μια επαναφορά των δεικτών της γενικής αίματος στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και αύξηση του αιματοκρίτη και των αιμοπεταλίων, συγκριτικά με την ομάδα σισπλατίνης αλλά και με τα άλλα σχήματα χορήγησης. Όσον αφορά τις βιοχημικές εξετάσεις, και εδώ παρατηρήθηκε μια βελτίωση στους βιοχημικούς δείκτες στην περίπτωση, όπου χορηγείται δόση 16mg/kg κουρκουμίνης πριν και μετά τη δόση σισπλατίνης. Παρατηρήθηκε βελτίωση, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική, στην ουρία, στην κρεατινίνη, στο ουρικό οξύ και στην τρανσαμινάση S-GPT. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κρεατινίνη και η ουρία, οι οποίες μειώθηκαν σημαντικά μετά από χορήγηση σισπλατίνης, βελτιώθηκαν σημαντικά από τη θεραπεία με κουρκουμίνη (557). Επίσης, η μελέτη μιας άλλης ερευνητικής ομάδας έδειξε ότι η σισπλατίνη προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της AST του ορού και των επιπέδων της ALT σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (μετά από χορήγηση μόνο φυσιολογικού ορού) σε αρσενικούς Wistar. Η κουρκουμίνη και/ή η α-τοκοφερόλη κατέδειξαν σημαντικά τη μείωση των επιπέδων της AST στον ορό. Η α-τοκοφερόλη, η κουρκουμίνη και ο συνδυασμός κουρκουμίνης με την α-τοκοφερόλη, επίσης, προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της ALT του ορού σε σύγκριση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε μόνο σισπλατίνη(562).

Πολυάριθμες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι οι συνδυασμοί ουσιών, που προέρχονται από φυτά με χημειοθεραπευτικές ουσίες, αναστέλλουν πιο αποτελεσματικά την ανάπτυξη του όγκου από τις ενώσεις, που χρησιμοποιούνται μεμονωμένα. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές, ενισχύοντας την επίδραση της θεραπείας, βοηθάνε στη μείωση της αποτελεσματικής δόσης του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, στον περιορισμό της ανθεκτικότητας στο χημειοθεραπευτικό, στην ύπαρξη μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας και στη μείωση της τοξικότητας. Τα φυτοχημικά φαίνεται να διαδραματίζουν ένα διττό ρόλο, καθώς ενώ σε χαμηλές δόσεις ασκούν προστατευτική επίδραση στα κύτταρα, σε υψηλές δόσεις έχουν τοξική δράση σε αυτά. Χρειάζεται

περαιτέρω έρευνα με στόχο τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων των φυτοχημικών σε κλινικές μελέτες, όπου θα περιλαμβάνονται δοκιμές σε ανθρώπους, καθώς και τη διαλεύκανση των κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών της δράσης τους, που είναι υπεύθυνη για την φαρμακολογική τους αποτελεσματικότητα.

Επιπλέον, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα, προκειμένου να διευκρινιστεί κατά πόσο οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία μελλοντική συμπληρωματική θεραπεία, εάν χορηγηθούν σε συνδυασμό με σισπλατίνη, στοχεύοντας στην ενίσχυση της δραστηριότητας της και στη μείωση των τοξικών επιδράσεων του φαρμάκου, λόγω των παρενεργειών, που προκαλεί. Τέλος, η ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων, που θα έχουν τη δυνατότητα να εμπεριέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, θα μπορούσε να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πτυχή για τη μελλοντική θεραπεία του καρκίνου. Σε εθνικό επίπεδο μια κλινική μελέτη που έγινε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η πρώτη της φάση δημοσιεύτηκε το 1994 είχε θετικά αποτελέσματα(566). Μια δεύτερη κλινική μελέτη που συνεχίζεται ακόμη και δεν έχει δημοσιευτεί δείχνει κατ' αρχάς ότι οι ασθενείς που παίρνουν αντιοξειδωτικά και χημειοθεραπευτικά εμφανίζουν βελτίωση και στις παραμέτρους των λειτουργιών τους, στην ποιότητα ζωής και στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης (Άγγελος Ευαγγέλου και Σπύρος Καρκαμπούνας – προσωπική ενημέρωση). Γενικά η συνύπαρξη αυτών των δύο θεραπευτικών κατευθύνσεων (φυτοχημικές ουσίες και χημειοθεραπευτικά) φαίνεται ότι είναι συμβατή, αλληλοενισχυόμενη και ελπιδοφόρα για μια βελτίωση της θεραπείας πολλών μορφών νεοπλασματικής νόσου. Εναπόκειται στους κλινικούς γιατρούς και στην λήψη πρωτοβουλιών εκ μέρους των Κρατικών μηχανισμών της Υγείας για να ενταχθούν αρμονικά και αποτελεσματικά οι εν λόγω ουσίες στα τρέχοντα και καθιερωμένα αντινεοπλασματικά σχήματα, επ' ωφελεία των νοσούντων συνανθρώπων καθώς ο καρκίνος επεκτείνεται συνεχώς και δεν ανακόπτεται η ανάδυση περισσότερων κρουσμάτων εξ αιτίας της μη ένταξης προληπτικών αλλά και συμπληρωματικά θεραπευτικών σχημάτων με φυτοχημικές ουσίες που είναι γνωστά ως δράσεις ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 70 (567).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή φυτοχημικά ασκούν στοχευμένη εκλεκτική δράση στα καρκινικά κύτταρα
2. Έχουν χαμηλό κόστος και η ικανότητα τους να προκαλούν αναστολή στα καρκινικά κύτταρα ασκείται με σύντομη έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες
3. Δεν ασκούν τοξική δράση στα φυσιολογικά κύτταρα που ελέγχθησαν
4. Η σισπλατίνη προκαλεί τοξικότητα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και στην φυσιολογική κυτταρική σειρά
5. Η προεπάωση καρκινικών κυτταρικών σειρών με τα φυτοχημικά αύξησε την δράση της σισπλατίνης, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι χρειάζεται λιγότερη ποσότητα φαρμάκου για να επιτευχθούν οι ίδιες τοξικές επιπτώσεις στον πληθυσμό των κυττάρων
6. Ο τρόπος με τον οποίο επάγεται ο κυτταρικός θάνατος στα καρκινικά κύτταρα, μετά τη χορήγηση σισπλατίνης είναι μέσω της απόπτωσης
7. Η χορήγηση σισπλατίνης αυξάνει το ποσοστό κυττάρων στην S φάση ενώ η προεπάωση των κυττάρων με τα φυτοχημικά δείχνει ότι, τα κύτταρα παραμένουν στην φάση ανάπτυξης (G0/G1), οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση
8. Η σισπλατίνη προκαλεί αναστολή στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και η προεπάωση των κυττάρων με τα φυτοχημικά ενίσχυσε την δράση του φαρμάκου
9. Η σισπλατίνη σε αμφότερες τις δόσεις των 5 mg/kg και 20 mg/kg αύξησε τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) στα ούρα πειραματοζώων, ενώ η χορήγηση κουρκουμίνης μείωσε τα επίπεδα μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) που προκαλούνται από σισπλατίνη
10. Το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη και στις δυο δόσεις χορήγησης προκαλεί μείωση στην δραστηριότητα της SOD και της GPx
11. Η χορήγηση κουρκουμίνης στα σχήματα συνδυασμού με το χημειοθεραπευτικό μπορεί να διατηρεί την ενδογενή αμυντική δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων
12. Η χορήγηση κουρκουμίνης επιφέρει μια ανάκαμψη στη λειτουργία του οργανισμού, όπως φανέρωσε η ανάλυση των αιματολογικών, μεταβολικών, διατροφικών και σε μικρότερο βαθμό των βιοχημικών δεικτών των πειραματοζώων σε σύγκριση με αυτούς των ζώων που έλαβαν μόνο σισπλατίνη

13. Φαίνεται ότι η σισπλατίνη προκαλεί πιο έντονη νεφροτοξικότητα παρά ηπατοτοξικότητα στα πειραματόζωα, και η χορήγηση κουρκουμίνης πριν και μετά από το φάρμακο δείχνει να εξασθενεί αυτές τις επιπτώσεις

14. Η χορήγηση κουρκουμίνης φαίνεται να μετριάζει την τοξική επίδραση της σισπλατίνης και η αποτελεσματικότητά της είναι μεγαλύτερη όταν χορηγείται πριν και μετά τη δόση του φαρμάκου

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως φυτοχημικά ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες παράγονται από τους μεταβολισμούς των φυτικών ειδών και ασκούν βιολογικές δράσεις στον άνθρωπο. Μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε καροτενοειδή, φαινολικά, αλκαλοειδή, ενώσεις που περιέχουν άζωτο, και οργανοθειούχες ενώσεις. Τα φυτοχημικά, που έχουν μελετηθεί πιο πολύ, είναι οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή.

Για την καλή λειτουργία του κυττάρου θα πρέπει να υπάρχει ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ώστε να διατηρηθούν οι βέλτιστες φυσιολογικές συνθήκες. Η υπερπαραγωγή των οξειδωτικών μορίων προκαλεί ανισορροπία στο οξειδαναγωγικό ισοζύγιο, οδηγώντας σε οξειδωτικό stress. Η πρόληψη ή η επιβράδυνση της οξειδωτικής καταστροφής που επάγει τον καρκίνο μπορεί να επιτευχθεί μέσω διατροφής ή φαρμακολογικής συμπλήρωσης με αντιοξειδωτικά και άλλα μόρια τα οποία βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά, ή έχουν κατασκευαστεί συνθετικά με πρότυπα απαντώντα κυρίως στα φυτά. Οι ασθενείς είναι δυνατόν να λαμβάνουν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα όταν υποβάλλονται στη χημειοθεραπεία, για να περιορίσουν τις τοξικές παρενέργειες της χημειοθεραπείας, και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της. Ωστόσο, η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων από ασθενείς, που υποβάλλονται στη χημειοθεραπεία, έχει αρνητικές κριτικές, λόγω των ανησυχιών, ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να παρέμβουν στο μηχανισμό δράσης της χημειοθεραπείας και ακολούθως να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τα φλαβονοειδή κουερσετίνη, επιγαλοκατεχίνη, ρουτίνη και ναρινγίνη. Τα φλαβονοειδή έχουν αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιϊκή δράση και αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή έχουν αντικαρκινική δράση, αφού παρεμβαίνουν στην αρχή, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου, με την διαφοροποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την απόπτωση, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την αγγειογένεση και την μετάσταση. Εκτός από τα φλαβονοειδή υπάρχουν αρκετές μη-φλαβονοειδείς πολυφαινόλες, που βρίσκονται στα τρόφιμα, οι οποίες θεωρούνται σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία και στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η ρεσβερατρόλη, το γαλλικό οξύ και η κουρκουμίνη.

Τα σύμπλοκα πλατίνης είναι γνωστά για την χρήση τους στη θεραπεία κατά του καρκίνου. Παρά τη θετική δράση ενώσεων πλατίνης οι ασθενείς, που λαμβάνουν αυτές τις ενώσεις, εμφανίζουν παρενέργειες, που περιορίζουν τις χορηγούμενες δόσεις. Η

θεραπεία κακοήθων νοσημάτων από το συνδυασμό ενός φυτοχημικού και ενός αντικαρκινικού φαρμάκου μπορεί να είναι μια ρεαλιστική και ελπιδοφόρα επιλογή. Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή δόθηκε έμφαση στο συνδυασμό σισπλατίνης και φυτοχημικών ουσιών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διαλεύκανση της επίδρασης των φυτοχημικών ενώσεων στην τοξική δράση της σισπλατίνης σε κυτταρικό επίπεδο και σε επίπεδο πειραματοζώων. Επιλέχθηκαν κάποια флаβονοειδή φυτοχημικά και συγκεκριμένα η κουερετίνη, η επιγαλοκατεχίνη η ναρινγίνη και η ρουτίνη όπως και κάποια μη φυτοχημικά флаβονοειδή και συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη, το γαλλικό οξύ, και η κουρκουμίνη. Η δράση των ουσιών αυτών μελετήθηκε *in vitro* σε κυτταρικά μοντέλα αλλά και σε *in vivo* μοντέλα τοξικότητας πειραματοζώων επίμυων Wistar.

Πρώτα μελετήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από φυτοχημικές ουσίες σε κυτταρικές σειρές με την μέθοδο MTT. Η επιγαλοκατεχίνη και η κουερετίνη εμφάνισαν την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από τα τέσσερα флаβονοειδή που δοκιμάστηκαν στην LMS κυτταρική σειρά. Τα флаβονοειδή ναρινγίνη και ρουτίνη έχουν πιο ήπια δράση στα LMS καρκινικά κύτταρα. Όσο αφορά τα μη флаβονοειδή φυτοχημικά, την πιο ισχυρή δράση παρουσίασε η κουρκουμίνη. Η δράση των φυτοχημικών ουσιών μελετήθηκε και στην κυτταρική σειρά H1299, καρκίνου πνεύμονα, μια σειρά ανθεκτική στην σισπλατίνη. Την πιο ισχυρή δράση από όλα τα φυτοχημικά στην κυτταρική σειρά H1299 παρουσίασε η κουρκουμίνη.

Τη δεύτερη φάση του πειράματος πραγματοποιήθηκε προεπάση των δυο κυτταρικών σειρών (LMS και H1299) με τα φυτοχημικά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη σισπλατίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1.25-80μM για τα LMS κύτταρα και 7.8-250 μM για την κυτταρική σειρά H1299. Η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης ήταν 8.6±1.1μM για τα LMS κύτταρα. Παρατηρείται μια αύξηση στην δράση της σισπλατίνης, όταν τα κύτταρα προεπώστηκαν με επιγαλοκατεχίνη, κουερετίνη, γαλλικό οξύ, και κουρκουμίνη. Όταν τα κύτταρα προεπώζονται με ναρινγίνη και ρουτίνη παρατηρείται μείωση στην δράση της σισπλατίνης. Η τιμή IC₅₀ της σισπλατίνης για τα H1299 κύτταρα υπολογίστηκε στην συγκέντρωση 43.0±6.8μM. Παρατηρείται μια αύξηση στην δράση της σισπλατίνης, όταν τα κύτταρα προεπώζονται με όλες τις φυτοχημικές ουσίες. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι προεπώζοντας με τα φυτοχημικά σημαίνει ότι θα

χρειαστεί η χορήγηση μικρότερης δόσεις της σισπλατίνης για να επιτευχθεί η τιμή IC₅₀ της.

Σε μια επόμενη φάση πειραμάτων μελετήθηκε η δράση των φυτοχημικών ουσιών, της σισπλατίνης, και του συνδυασμού σισπλατίνης, και φυτοχημικών στην φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC-5 (ινοβλάστες). Τα φλαβονοειδή έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, και δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Παρατηρείται επίσης ότι όταν προεπώαζουμε την MRC-5 κυτταρική σειρά με τα φυτοχημικά και στη συνέχεια προσθέτουμε την σισπλατίνη δεν παρατηρείται επιπλέον τοξικότητα στην δράση της σισπλατίνης.

Με βάση τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για να προσδιοριστεί ο μηχανισμός με τον οποίο επάγεται ο κυτταρικός θάνατος στα LMS κύτταρα, παρατηρείται πως ο τρόπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά τη χορήγηση σισπλατίνης είναι αποπτωτικός. Επίσης παρατηρείται ότι προεπάωση των LMS κυττάρων με επιγαλοκατεχίνη, κουερσετίνη, γαλλικό οξύ και κουρκουμίνη αύξησε επιπλέον την απόπτωση των κυττάρων συγκριτικά με την σισπλατίνη. Η κουρκουμίνη ήταν η ουσία που η προεπάωση με αυτήν των LMS κυττάρων, προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση στην απόπτωση συγκριτικά με την σισπλατίνη. Όσον αφορά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα LMS κύτταρα, η χορήγηση σισπλατίνης στην τιμή του IC₅₀ (8,6μM), έδειξε να αυξάνει το ποσοστό κυττάρων στην S φάση. Ενώ η προεπάωση των κυττάρων με τα φυτοχημικά δείχνει ότι τα κύτταρα παραμένουν στην φάση ανάπτυξης (G0/G1), οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση.

Ελέγχτηκε εν συνεχεία η ικανότητα σισπλατίνης, φυτοχημικών και του συνδυασμού αυτών να αναστέλλουν την ικανότητα των κυττάρων LMS να αναπτύσσουν μεγάλες αυτοσυντηρούμενες αποικίες. Η προεπάωση των κυττάρων με τα φυτοχημικά αύξησε το ποσοστό ανάπτυξης αποικιών μετά από προσθήκη σισπλατίνης. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τα προηγούμενα μας αποτελέσματα, και αυτό ίσως να εξηγείται λόγω της μικρής δόσεις της σισπλατίνης (1μM) με την οποία επώαστηκαν τα LMS κύτταρα.

Έπειτα μελετήθηκε η επίδραση φυτοχημικών, της σισπλατίνης και του συνδυασμού αυτών στις οξειδο-αναγωγικές αντιδράσεις των μιτοχονδρίων. Παρατηρείται ότι η σισπλατίνη προκαλεί αναστολή στην λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία αναστολή

αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της σισπλατίνης. Ο συνδυασμός φυτοχημικών και σισπλατίνης ενισχύει τη δράση της σισπλατίνης.

Μελετήθηκε η τοξικότητα της χορήγησης σισπλατίνης σε επίμυες Wistar Rat σε δυο δόσεις χορήγησης όπως και το φυτοχημικό κουρκουμίνη σε 3 δόσεις 4, 8 και 16 mg/kg σε 3 σχήματα χορήγησης 1. Πριν την δόση της σισπλατίνης 2. Μετά την δόση της σισπλατίνης 3. Πριν και μετά την δόση της σισπλατίνης.

Παρατηρείται ότι η σισπλατίνη και στις δύο δόσεις 5mg/kg και 20mg/kg αυξάνει τα επίπεδα της μαλονικής διαλδεΐδης (MDA) στα ούρα πειραματοζώων. Η χορήγηση κουρκουμίνης πριν την χορήγηση σισπλατίνης όπως και όταν χορηγούνται πριν και μετά την σισπλατίνη αποδείχτηκε ότι μειώνουν τα αυξημένα επίπεδα μαλονικής διαλδεΐδης(MDA) που προκαλούνται από σισπλατίνη.

Το χημειοθεραπευτικό σισπλατίνη και στις δυο δόσεις χορήγησης προκαλεί μείωση στην δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPx σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση κουρκουμίνης στα σχήματα συνδιασμού με το χημειοθεραπευτικό αύξησε την δραστηριότητα της SOD και της GPx σε όλους τους συνδυασμούς και όλες τις δόσεις.

Από τα αποτελέσματα εξετάσεων γενικής αίματος παρατηρείται ότι η σισπλατίνη στην δόση 5mg/kg προκάλεσε μείωση στον αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων και αύξηση στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων όπως και τα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι όταν πριν από την σισπλατίνη χορηγήθηκε η μεγάλη δόση κουρκουμίνης (16mg/kg) εμφανίστηκε αποκατάσταση στους αιματολογικούς δείκτες ενώ η χορήγηση της κουρκουμίνης μετά την σισπλατίνη δεν επανέφερε τους βιοχημικούς δείκτες στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Στην περίπτωση όπου χορηγήθηκε κουρκουμίνη πριν και μετά την δόση σισπλατίνης αποτελεί το πιο αποτελεσματικό σχήμα χορήγησης για την επαναφορά των δεικτών της γενικής αίματος.

Όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες η σισπλατίνη προκαλεί μείωση σε όλους τους δείκτες που αποτελούν ενδείξεις για βλάβες στα νεφρά και στο ήπαρ. Η χορήγηση μεγάλης δόσης κουρκουμίνης 16mg/kg πριν και μετά την σισπλατίνη επανέφερε τους δείκτες στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα με στόχο τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων των φυτοχημικών σε πειραματόζωα που έχουν αναπτύξει όγκο και σε κλινικές μελέτες.

Τέλος, η ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων, που θα έχουν τη δυνατότητα να εμπεριέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, θα μπορούσε να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πτυχή για τη μελλοντική θεραπεία του καρκίνου.

7. ABSTRACT

The “phyto-“of the word phytochemical is derived from the Greek word which means plants. Therefore phytochemicals are plant chemicals that can exert biological effect in animals and humans. The phytochemicals are divided in several classes like carotenoids, phenolics, alkaloids, nitrogen-containing compounds and sulfur compounds. The phytochemicals, which have been studied most, are phenols and flavonoids.

It is necessary to maintain a balance between oxidants and antioxidants to sustain optimal physiologic conditions in the body. The overproduction of oxidants causes imbalance in the redox status of the cell, leading to oxidative stress. The oxidative destruction which can induce carcinogenesis can be reduced or prevented by dietary or pharmacological supplements with antioxidants that are found in fruits and vegetables, or manufactured synthetically. The fruit, vegetables and wholemeal grains contain a variety of antioxidants which enhance the protection of the cellular system against the oxidative damage.

Patients may receive antioxidant supplements when undergoing chemotherapy, to relieve side effects and toxicity of chemotherapy, and increase its efficiency. However, the use of antioxidant supplements in patients undergoing chemotherapy, has received negative reviews, because it is believed that antioxidants may interfere with the mechanism of action of chemotherapy and may reduce its effectiveness.

In this doctorate thesis the flavonoids quercetin, epigallocatechin, rutin and naringin were studied. An important activity of flavonoids is to prevent injury caused by free radicals derived from oxygen. It is known that flavonoids inhibit lipid peroxidation, platelet aggregation, and the action of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes. Flavonoids are potent bioactive molecules possessing anticarcinogenic properties since they can interfere with the initiation, development and progression of cancer. Studies have shown that flavonoids can interfere in the modulation of cell proliferation, induce apoptosis, inhibit cell cycle of cancer cells, and also inhibit angiogenesis and metastasis. Besides flavonoids, there are also several non-flavonoid polyphenols found in food, which are considered important to human health, and in the present dissertation we studied three of them resveratrol, gallic acid and curcumin.

Platinum complexes are known for their use in cancer therapy. Despite the positive effect of platinum compounds patients that undergo chemotherapy exhibit side effects, so this limits platinum dose.

The aim of this study is to investigate the effect of selected phytochemical substances alone and in combination with the chemotherapeutic drug cisplatin. We studied flavonoid phytochemical quercetin, epigallocatechin, naringin and rutin as well as some non-flavonoid phytochemicals resveratrol, gallic acid, and curcumin. The effect of these substances was studied *in vitro* in cancer and normal cell lines and curcumin in combination with cisplatin was studied *in vivo* in Wistar rat animal models. The ability of these substances to inhibit cell proliferation was studied in LMS and H1299 cancer cell lines using the MTT staining technique. Epigallocatechin and quercetin showed stronger antitumor activity of four flavonoids tested on LMS cell line. Flavonoids naringin and rutin have weak effect on LMS cancer cell line. Moreover, between the non-flavonoid phytochemicals, the stronger activity on LMS cells was shown by curcumin. The activity of phytochemical substances was also studied in H1299 cell line of lung cancer, a cell line that is resistant to cisplatin. Epigallocatechin and naringin showed stronger antitumor activity among four flavonoids in H1299 cell line. Flavonoids quercetin and rutin did not have a strong effect in the cell line of lung cancer. Between non-flavonoid phytochemicals, gallic acid and resveratrol have similar strong effect on H1299 cells. The most potent activity among the non-flavonoid phytochemicals on H1299 cell line was shown by curcumin.

Moreover, pre-incubation of two cell lines (LMS and H1299) with phytochemicals quercetin, naringin, epigallocatechin, rutin, gallic acid, resveratrol and curcumin was performed then cisplatin in concentrations from 1.25-80 μ M for LMS cells and 7.8-250 μ M for H1299 cell line was added. The IC₅₀ value of cisplatin was calculated at concentration 8.6 \pm 1.1 μ M for LMS cells. An increase in the activity of cisplatin when cells were pre-incubated with quercetin and epigallocatechin was observed. When the cells were pre-incubated with naringin and rutin a decrease in the effect of cisplatin was observed. When cells were pre-incubated with gallic acid and curcumin, there was also an increase in the activity of the cisplatin. In addition, the pre-incubation with phytochemical

resveratrol showed a decrease in the activity of cisplatin. Curcumin is the substance which showed the greatest increase in the activity of cisplatin.

The IC₅₀ value of cisplatin on H1299 cell line was calculated at the concentration of 43.0 ± 6.8 μM. It was observed an increase in the activity of cisplatin when cells were pre-incubated with all phytochemicals. A difference between LMS and H1299 cells when they were pre-incubated with resveratrol which enhanced the toxicity of cisplatin on H1299 cell line than in LMS cells was observed. We conclude that pre-incubation with phytochemicals needs lower cisplatin dose to achieve its IC₅₀ value.

Moreover, it was studied the effect of phytochemicals, cisplatin, and the combination of cisplatin and phytochemicals on fibroblast normal cell line MRC-5. We conclude that flavonoids have greater toxicity on tumor cell lines, and no effect on normal cells. It was also observed that pre-incubation of MRC-5 cell line with phytochemicals before the addition of cisplatin was observed more toxicity effect of cisplatin.

According to flow cytometry results, cisplatin triggered apoptotic death in LMS cells. Also it was observed that pre-incubation of LMS cells with epigallocatechin, quercetin, gallic acid and curcumin enhances apoptosis of cells compared to cisplatin. Naringin did not show any changes in apoptosis compared to cisplatin alone. The pre-incubation with curcumin caused the greatest increase in apoptosis of LMS cells compared to cisplatin alone at a percentage of 16%. Moreover it was performed cell cycle analysis in a Flow cytometer. Administration of cisplatin in a dose of 8,6 μM (IC₅₀), showed S –phase cell cycle arrest. While pre-incubation of the cells with phytochemicals shows that the cells remain in growth phase (G0/G1), leading the cells to apoptosis.

It was observed that after exposing cells to very low concentration of cisplatin of 1 μM the colony growth of LMS cells is difficult, and is at about 40%. At concentrations higher than 2.5 μM of cisplatin it was impossible the growth of colonies. When the cells are exposed to phytochemicals, colony development is very close to the control. Pre-incubation with phytochemicals increased colony growth rate after addition of cisplatin. This result is in contrast to our previous results, and this may be attributed to the low doses of cisplatin with which LMS cells were incubated.

To determine the metabolic capacity of mitochondria in live cells we used Mitochondrial Viability Stain kit from abcam (ab129732). It is observed that cisplatin induces inhibition

of mitochondrial function. The combination of cisplatin and phytochemicals enhances the inhibition of mitochondrial function.

Moreover, the toxicity of cisplatin administration to Wistar Rat was studied. Two doses of cisplatin, and 3 doses of curcumin 4, 8 and 16 mg/kg b/w were administered i.p. as follows 1. Curcumin i.p. injected after cisplatin 2. Curcumin i.p. injected after the cisplatin 3. Curcumin i.p. injected before and after cisplatin.

Cisplatin both doses 5 mg/kg and 20 mg/kg increased the levels of malondialdehyde (MDA) in urine of Wistar rats. The administration of curcumin in the doses of 4 mg/kg and 8 mg/kg before the administration of cisplatin as well as the administration of curcumin before and after the injection of cisplatin decreases the levels of MDA induced by cisplatin. In the group of administration of curcumin 16 mg/kg + CP 20 mg/kg there is a reduction of the MDA, as well as in the group of administration of curcumin 4mg/kg + CP 20 mg/kg + curc 4 mg/kg.

The chemotherapeutic cisplatin in both doses 5 mg/kg and 20 mg/kg causes a decrease in the activity of SOD (superoxide dismutase) in comparison to control group. The administration of curcumin in combination to chemotherapeutic drug increased the activity of SOD in all modes and all doses. Cisplatin exerted a reduction in the activity of glutathione peroxidase. All combinations of curcumin and cisplatin brought an increase in the GPx enzyme activity.

Blood tests showed that cisplatin in a dose of 5mg/kg caused a reduction in red blood cell and increased counts the number of white blood cells as well as the number of platelets. Moreover, when curcumin was administered before cisplatin in a dose of 16mg/kg there was a recovery in hematological parameters. In addition when curcumin was administered after cisplatin injection, reset of the biochemical parameters to the levels of control group was not achieved. When curcumin was administered before and after cisplatin was observed that curcumin 16mg/kg completely restored blood parameters.

Moreover, cisplatin cause decreased all biochemical indicators of kidney and liver indicators. Curcumin 16mg/kg prior to and after cisplatin restored the indicators at the control group levels.

Further research is needed to identify the effects of phytochemicals in animal tumorigenesis and clinical studies.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Doll R. The lessons of life : Keynote address to the Nutrition and Cancer Conference. *Cancer Research*. April 1992; 52.
2. Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*. 1986 Sep 26;46(7):959-61.
3. Wattenberg LW, Page MA, Leong JL. Induction of increased benzo[a]pyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. *Cancer Res*. 1968 May;28(5):934-7.
4. Kallistratos G, Pfau A. [Effect of 3,4-benzopyrene on large mammals]. *Naturwissenschaften*. 1971 Apr;58(4):222.
5. Kallistratos G. Putrescine as Inhibitor of 3,4-Benzopyrene Cancerogenesis. *Cancer J Europ*. 1975;Vol. 11.(Pergamon Press):pp. 717-9.
6. Pauling L, Anderson R, Banic S, Basu TK, Kallistratos G, Murata A, et al. Workshop on vitamin C in immunology and cancer. *International journal for vitamin and nutrition research. Supplement Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung* 1982;Volume 23:209-19.
7. Kallistratos G, Donos A, Evangelou A, Fasske E. The paradoxical effect of vitamin C on benzo[a]pyrene-induced tumors and malignancy. *Naturwissenschaften*. 1984 Mar;71(3):160-1.
8. Kallistratos GI, Fasske EE, Karkabounas S, Charalambopoulos K. Prolongation of the survival time of tumor bearing Wistar rats through a simultaneous oral administration of vitamins C + E and selenium with glutathione. *Progress in clinical and biological research*. 1988;Volume 259:Pages 377-89.
9. Kallistratos G, Evangelou A, Agnantis N, Fasske E, Karkabounas S, Donos A. Enhancement of the antineoplastic effect of anticarcinogens on benzo[a]pyrene-treated Wistar rats, in relation to their number and biological activity. *Cancer Lett*. 1994 Jul 29;82(2):153-65.
10. Evangelou A, Kalpouzou G, Karkabounas S, Liasko R, Nonni A, Stefanou D, et al. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Lett*. 1997 May 1;115(1):105-11.
11. Evangelou A, Karkabounas S, Kalpouzou G, Malamas M, Liasko R, Stefanou D, et al. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett*. 1997 Nov 11;119(2):221-5.
12. Charalabopoulos K, Karkabounas S, Charalampopoulos A, Papalimneou V, Ioachim E, Giannakopoulos X. Inhibition of benzo[a]pyrene induced carcinogenesis by vitamin C alone and by pairs of vitamin C – vitamin E and Selenium-Glutathion. *Biol Trace Elem Res* 2002 July:201-12.
13. Papaioannou A, Manos M, Karkabounas S, Liasko R, Evangelou AM, Correia I, et al. Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. *J Inorg Biochem*. 2004 Jun;98(6):959-68.
14. Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, et al. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res*. 1998 Sep-Oct;18(5A):3609-13.
15. Karkabounas S, Kostoula OK, Daskalou T, Veltsistas P, Karamouzis M, Zelovitis I, et al. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvedilol. *Exp Oncol*. 2006 Jun;28(2):121-5.
16. Karkabounas S, Binolis J, Zelovitis J, Kotsis N, Charalabopoulos A, Avdilos A, et al. Inhibition and modification of benzo[a]pyrene induced chemical carcinogenesis of ascorbic acid alone or in combination with alpha-tocopherol in Wistar rats. *Experimental Oncology*. 2002 December:274-8.
17. Toliopoulos IK, Simos YV, Daskalou TA, Verginadis I, Evangelou AM, Karkabounas SC. Inhibition of platelet aggregation and immunomodulation of NK lymphocytes by administration of ascorbic acid. *Indian J Exp Biol*. 2011 Dec;49(12):904-8.
18. Toliopoulos I, Simos Y, Verginadis I, Oikonomidis S, Karkabounas S. NK cell stimulation by administration of vitamin C and Aloe vera juice in vitro and in vivo: A pilot study. *Journal of Herbal Medicine*. 2012 (2):29-33.
19. Toliopoulos IK, Simos YV, Oikonomidis S, Karkabounas SC. Resveratrol diminishes platelet aggregation and increases susceptibility of K562 tumor cells to natural killer cells. *Indian J Biochem Biophys*. 2013 Feb;50(1):14-8.
20. Temple NJ. Re: "Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women". *Am J Epidemiol*. 2000 Mar 15;151(6):634-5.
21. Willett WC. Micronutrients and cancer risk. *Am J Clin Nutr*. 1994 May;59(5 Suppl):1162S-5S.
22. Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*. 2002 Apr 26;296(5568):695-8.

23. Willett WC. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect.* 1995 Nov;103 Suppl 8:165-70.
24. Liu HR. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal for Clinical Nutrition.* 2003;78(suppl)(5):175-205.
25. Shahidul Islam M, Tanaka M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull.* 2004 Apr;48(7-8):624-49.
26. Grant WB. Air pollution in relation to U.S. cancer mortality rates: an ecological study; likely role of carbonaceous aerosols and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anticancer Res.* 2009 Sep;29(9):3537-45.
27. Hop H, Borga K, Gabrielsen GW, Kleivane L, Skaare JU. Food web magnification of persistent organic pollutants in poikilotherms and homeotherms. *Environ Sci Technol.* 2002 Jun 15;36(12):2589-97.
28. Harris R. Ecological implication of mercury pollution in aquatic systems. *Biological Conservation.* 1971 July 1971;Volume 3(Issue 4):279-83.
29. Borga K, Kidd KA, Muir DC, Berglund O, Conder JM, Gobas FA, et al. Trophic magnification factors: considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integr Environ Assess Manag.* 2012 Jan;8(1):64-84.
30. Devasagayam TP, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004 Oct;52:794-804.
31. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol.* 2011 Jan 17;101(1):13-30.
32. Moller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Brauner EV, Danielsen PH, Risom L, et al. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):84-97.
33. Torres MA, Barros MP, Campos SC, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008 Sep;71(1):1-15.
34. Crane M, Watts C, Boucard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ.* 2006 Aug 15;367(1):23-41.
35. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006 Jun;64(2):178-89.
36. Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res.* 2005 Dec 30;592(1-2):119-37.
37. Poljsak B, Fink R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:671539.
38. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul;4(8):118-26.
39. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 2003 Aug;60(8):612-6.
40. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14.
41. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996 Jan;32A(1):30-8.
42. Athar M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* 2002 Jun;40(6):656-67.
43. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
44. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 2006 Jun 30;125(7):1241-52.
45. Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med.* 2013 Jun;273(6):529-43.
46. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):483-95.
47. Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):497-512.
48. Elsner M, Gehrman W, Lenzen S. Peroxisome-Generated Hydrogen Peroxide as Important Mediator of Lipotoxicity in Insulin-Producing Cells. *DIABETES.* 2011 January;VOL. 60.
49. Santo A, Zhu H, Li R. Free Radicals: From Health to Disease 2016;Vol 2(No 4).
50. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011 Jul 15;254(2):86-99.

51. Titorenko VI, Terlecky SR. Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic*. 2011 Mar;12(3):252-9.
52. Gehrmann W, Elsner M. A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes. *Free Radic Res*. 2011 May;45(5):501-6.
53. Azzam El, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 2012 Dec 31;327(1-2):48-60.
54. Szumiel I. Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria. *Int J Radiat Biol*. 2015 Jan;91(1):1-12.
55. Kam WW, Banati RB. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:607-19.
56. Namazi MR. Cytochrome-P450 enzymes and autoimmunity: expansion of the relationship and introduction of free radicals as the link. *J Autoimmune Dis*. 2009;6:4.
57. Shimada T, Gillam EM, Sutter TR, Strickland PT, Guengerich FP, Yamazaki H. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos*. 1997 May;25(5):617-22.
58. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*. 2004 Feb-Apr;25(1-2):17-26.
59. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000 Mar;3(1):3-8.
60. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3 Suppl):517S-20S.
61. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
62. Freedman J. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008 March; Volume 28(Issue 3).
63. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5 Suppl):S294-301.
64. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec;20(12):2702-8.
65. Brochner AC, Toft P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2009 Sep 15;17:43.
66. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*. 1999 Dec 17;232(1-2):3-14.
67. Johnson JL, Moore EE, Hiester AA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb;65(2):211-6.
68. Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):95-105.
69. Murphy JK, Hoyal CR, Livingston FR, Forman HJ. Modulation of the alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*. 1995 Jan;18(1):37-45.
70. Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Dhariwal KR, Klein HG, Levine M. Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J Biol Chem*. 1990 Feb 15;265(5):2584-7.
71. Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*. 2001 Jun 15;292(5524):2083-6.
72. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *J Korean Med Sci*. 2007 Feb;22(1):7-11.
73. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res*. 1991 Sep-Oct;250(1-2):3-16.
74. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec 4;50(25):7449-54.
75. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002 Nov 6;50(23):6910-6.
76. Adom KK, Liu RH. Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct 9;50(21):6182-7.
77. Vinson JA, Jang J. In Vitro and In Vivo Lipoprotein Antioxidant Effect of a Citrus Extract and Ascorbic Acid on Normal and Hypercholesterolemic Human Subjects. *J Med Food*. 2001 Winter;4(4):187-92.
78. Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *CA Cancer J Clin*. 1977 May-Jun;27(3):174-81.

79. Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2013 12//;5(6):203-9.
80. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*. 2004 Dec;134(12 Suppl):3479S-85S.
81. Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1993 Dec;101 Suppl 5:35-44.
82. Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong AN. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther*. 2013 Feb;137(2):153-71.
83. de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr*. 2008 May;47 Suppl 2:51-9.
84. Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, et al. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Nov 6;88(21):1560-70.
85. Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1;22(3):517-28.
86. Kyle RA, Shampo MA. Albert Szent-Gyorgyi--Nobel laureate. *Mayo Clin Proc*. 2000 Jul;75(7):722.
87. Edsall JT. Linus pauling and vitamin C. *Science*. 1972 Nov 17;178(4062):696.
88. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996 May 2;334(18):1150-5.
89. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996 Mar 23;347(9004):781-6.
90. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996 May 2;334(18):1145-9.
91. Greenberg ER, Baron JA, Stukel TA, Stevens MM, Mandel JS, Spencer SK, et al. A clinical trial of beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin. The Skin Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1990 Sep 20;323(12):789-95.
92. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. The ATBC Cancer Prevention Study Group. *Ann Epidemiol*. 1994 Jan;4(1):1-10.
93. Qiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD, et al. Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Apr 1;101(7):507-18.
94. Boon H, Brown J, Gavin A. What are the experiences of women with breast cancer as they decide whether to use complementary/alternative medicine? *West J Med*. 2000 Jul;173(1):39.
95. Burstein HJ, Gelber S, Guadagnoli E, Weeks JC. Use of alternative medicine by women with early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 1999 Jun 3;340(22):1733-9.
96. Gupta D, Lis CG, Birdsall TC, Grutsch JF. The use of dietary supplements in a community hospital comprehensive cancer center: implications for conventional cancer care. *Support Care Cancer*. 2005 Nov;13(11):912-9.
97. Kumar NB, Hopkins K, Allen K, Riccardi D, Besterman-Dahan K, Moyers S. Use of complementary/integrative nutritional therapies during cancer treatment: implications in clinical practice. *Cancer Control*. 2002 May-Jun;9(3):236-43.
98. Lee MM, Lin SS, Wrensch MR, Adler SR, Eisenberg D. Alternative therapies used by women with breast cancer in four ethnic populations. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Jan 5;92(1):42-7.
99. Molassiotis A. Complementary and alternative medicine use in lung cancer patients in eight European countries. *Complementary therapies in clinical practice*. 2006 February;Volume 12(1):34-9.
100. Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J Clin Oncol*. 2000 Jul;18(13):2505-14.

- 101.D'Andrea GM. Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. *CA Cancer J Clin*. 2005 Sep-Oct;55(5):319-21.
- 102.Conklin KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr*. 2004 Nov;134(11):3201S-4S.
- 103.Evangelou AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994 Jan;50(1):1-28.
- 104.Alberts DS, Noel JK. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs*. 1995 Jun;6(3):369-83.
- 105.Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol*. 2005;148:107-21.
- 106.Hrelia S, Bordoni A, Angeloni C, Leoncini E, Biagi P. Nutritional interventions to counteract oxidative stress in cardiac cells. *Ital J Biochem*. 2004 Dec;53(4):157-63.
- 107.Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*. 2004 Dec;3(4):294-300.
- 108.Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Dec;12(12):931-47.
- 109.Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, et al. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett*. 1997 Jun 9;409(2):287-91.
- 110.Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(1):15-9.
- 111.Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 2000 Jun;44(3):158-63.
- 112.Shahidi F. Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *Biofactors*. 2000;13(1-4):179-85.
113. Qin R, Zhao Y, Zhao Y, Zhou W, Lv C, Lu J. Polyphenolic compounds with antioxidant potential and neuro-protective effect from *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. *Fitoterapia*. 2016 Sep 28;115:52-6.
- 114.Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, et al. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*. 2016 Aug 22;8(8).
- 115.Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*. 2012 Feb;38(1):76-87.
- 116.Tsuda H, Iemura A, Sata M, Uchida M, Yamana K, Hara H. Inhibitory effect of antineoplaston A10 and AS2-1 on human hepatocellular carcinoma. *Kurume Med J*. 1996;43(2):137-47.
- 117.Middleton E, Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*. 1998;439:175-82.
- 118.Seleem D, Pardi V, Murata RM. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Arch Oral Biol*. 2016 Aug 27.
- 119.Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995 Dec;33(12):1061-80.
- 120.Alqurashi RM, Galante LA, Rowland IR, Spencer JP, Commane DM. Consumption of a flavonoid-rich acai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *Am J Clin Nutr*. 2016 Sep 28.
- 121.Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*. 1997 Mar 8;349(9053):699.
- 122.Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 Feb 24;312(7029):478-81.
- 123.Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol*. 1996 Nov-Dec;48(6):555-64.
- 124.Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*. 1996 Aug;24(3):790-5.
- 125.Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2016 Oct 16.
- 126.Oglesby L, Ananga A, Obuya J, Ochieng J, Cebert E, Tsolova V. Anthocyanin Accumulation in Muscadine Berry Skins Is Influenced by the Expression of the MYB Transcription Factors, MybA1, and MYB1. *Antioxidants (Basel)*. 2016 Oct 12;5(4).
- 127.Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Nov;26(5):343-56.

- 128.Lani R, Hassandarvish P, Shu MH, Phoon WH, Chu JJ, Higgs S, et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Res.* 2016 Sep;133:50-61.
- 129.Cook NC, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 1996 1996/02/01;7(2):66-76.
- 130.Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 1;36(7):838-49.
- 131.Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser J-M, Ghoul M. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry.* 2006 11//;41(11):2237-51.
- 132.Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. 2001 33(1):2-16.
- 133.de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology.* 1994 Aug;41(4):328-32.
- 134.Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994 May;81(5):637-47.
- 135.Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74(4):418-25.
- 136.Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure,biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry.*2007//;104(2):466-79.
- 137.Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002 Oct;13(10):572-84.
- 138.Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules.* 2010 Apr 29;15(5):3135-70.
- 139.Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202.
- 140.Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother.* 2002 Aug;56(6):296-301.
- 141.Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem.* 2007 Jul;18(7):427-42.
- 142.Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, Edwards GO, Chipman JK. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis.* 2002 Jan;17(1):45-53.
- 143.Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* 1999 Jun 15;340 (Pt 3):715-22.
- 144.Kang ZC, Tsai SJ, Lee H. Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutr Cancer.* 1999;35(2):175-9.
- 145.Muto S, Fujita K, Yamazaki Y, Kamataki T. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat Res.* 2001 Aug 8;479(1-2):197-206.
- 146.Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol.* 1998 Aug;36(8):617-21.
- 147.Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998 Jun 1;58(11):2379-84.
- 148.Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.* 1992 Jul 15;52(14):4050-2.
- 149.Valerio LG, Jr., Kepa JK, Pickwell GV, Quattrochi LC.Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase(NQO1) gene expression by the flavonol quercetin.*Toxicol Lett.* 2001 Feb3;119(1):49-57.
- 150.Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, et al. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Dec 17;11(24):3095-7.
- 151.Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3823-31.
- 152.Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999 Jun;38(3):133-42.
- 153.Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.* 1994;55(13):1061-9.

154. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anticancer Res.* 1999 Mar-Apr;19(2A):1261-9.
155. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 1993 Nov-Dec;13(6A):2165-70.
156. Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000 Sep;64(9):1813-20.
157. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Jul;91(7):686-91.
158. Markovits J, Linossier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 1989 Sep 15;49(18):5111-7.
159. Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001 Jan 12;68(8):921-31.
160. Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res.* 1996 Nov 1;56(21):4904-9.
161. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res.* 1996 Apr;2(4):659-68.
162. Brueggemeier RW. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *Am J Ther.* 2001 Sep-Oct;8(5):333-44.
163. Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Arch Pharm Res.* 1999 Jun;22(3):309-12.
164. Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G, Cappelletti V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer.* 1999 Jun;80(8):1150-5.
165. Senderowicz AM. Cyclin-dependent kinase modulators: a novel class of cell cycle regulators for cancer therapy. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 2001;19:165-88.
166. Senderowicz AM. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia.* 2001 Jan;15(1):1-9.
167. Zi X, Grasso AW, Kung HJ, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res.* 1998 May 1;58(9):1920-9.
168. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol.* 2001 Oct;19(4):837-44.
169. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 2001 May 15;61(10):1205-15.
170. Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Dec;3(6):1009-21.
171. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987 Apr 25;262(12):5592-5.
172. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer.* 1996;26(2):167-81.
173. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandner G, Hess RD. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene.* 1996 Oct 17;13(8):1605-14.
174. Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, et al. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2000 Jan-Feb;20(1A):271-7.
175. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid.* 1999 Apr;9(4):369-76.
176. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer.* 1999 Oct;35(10):1517-25.

177. De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, et al. In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;46(4):305-12.
178. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem*. 2000 Jan;7(1):39-58.
179. Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2000;23(2-4):185-90.
180. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol*. 2002 Jan 15;63(2):225-36.
181. Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4339-45.
182. König A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4307-12.
183. Kim SY, Gao JJ, Kang HK. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol Pharm Bull*. 2000 Apr;23(4):451-5.
184. Mata-Greenwood E, Ito A, Westenburg H, Cui B, Mehta RG, Kinghorn AD, et al. Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. *Anticancer Res*. 2001 May-Jun;21(3B):1763-70.
185. Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998 Nov;62(11):2199-204.
186. Honma Y, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Hozumi M, Umezawa K. Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Jpn J Cancer Res*. 1990 Nov;81(11):1132-6.
187. Constantinou A, Kiguchi K, Huberman E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res*. 1990 May 1;50(9):2618-24.
188. Canivenc-Lavier MC, Vernevauf MF, Totis M, Siess MH, Magdalou J, Suschetet M. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*. 1996 Nov 15;114(1):19-27.
189. Shih H, Pickwell GV, Quattrochi LC. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jan 1;373(1):287-94.
190. Moon YJ, Sagawa K, Frederick K, Zhang S, Morris ME. Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *AAPS J*. 2006 Jul 07;8(3):E433-42.
191. Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med*. 2000 Dec 15;29(12):1234-43.
192. Zhang Q, Zhao X-H, Wang Z-J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicology in Vitro*. 2009 8//;23(5):797-807.
193. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem*. 2009 Jan 1;106(1):73-82.
194. Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, Chao PD, Chou CC, Wei YH, et al. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metab Dispos*. 2006 Feb;34(2):296-304.
195. Nair HK, Rao KV, Aalinkeel R, Mahajan S, Chawda R, Schwartz SA. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Jan;11(1):63-9.
196. Mu C, Jia P, Yan Z, Liu X, Li X, Liu H. Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007 Apr;29(3):179-83.
197. Chien SY, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF, Tsou MF, et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2009 Aug;28(8):493-503.

- 198.Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Lugli E, Nemes E, Nasi M, et al. Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic Res.* 2005 Nov;39(11):1249-58.
- 199.Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, Roat E, Prada N, Nasi M, et al. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A.* 2005 Nov;68(1):28-35.
- 200.Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, et al. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer.* 2002 Apr 10;98(5):761-9.
- 201.Ma HB, Hu HT, Di ZL, Wang ZR, Shi JS, Wang XJ, et al. Association of cyclin D1, p16 and retinoblastoma protein expressions with prognosis and metastasis of gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 7;11(5):744-7.
- 202.Shan BE, Wang MX, Li RQ. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest.* 2009 Jul;27(6):604-12.
- 203.Kuo PC, Liu HF, Chao JI. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):55875-85.
- 204.Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Rami A, von Deimling A. Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. *Neuro Oncol.* 2009 Apr;11(2):122-31.
- 205.Lee YK, Hwang JT, Kwon DY, Surh YJ, Park OJ. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPKalpha1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett.* 2010 Jun 28;292(2):228-36.
- 206.Gupta K, Panda D. Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry.* 2002 Oct 29;41(43):13029-38.
- 207.Jung YH, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim YH. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. *Life Sci.* 2010 Feb 27;86(9-10):351-7.
- 208.Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull.* 2005 Feb;28(2):253-9.
- 209.Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr.* 2006 Nov;136(11):2715-21.
- 210.Duraj J, Zazrivcova K, Bodo J, Sulikova M, Sedlak J. Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma.* 2005;52(4):273-9.
- 211.Ishikawa Y, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 20;279(2):629-34.
- 212.Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, et al. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate.* 2008 Dec 1;68(16):1773-89.
- 213.Wang RE, Kao JL, Hilliard CA, Pandita RK, Roti Roti JL, Hunt CR, et al. Inhibition of heat shock induction of heat shock protein 70 and enhancement of heat shock protein 27 phosphorylation by quercetin derivatives. *J Med Chem.* 2009 Apr 9;52(7):1912-21.
- 214.Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jun;71(6 Suppl):1698S-702S; discussion 703S-4S.
- 215.Lambert JD, Lee MJ, Diamond L, Ju J, Hong J, Bose M, et al. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug Metab Dispos.* 2006 Jan;34(1):8-11.
- 216.Shimizu M, Deguchi A, Joe AK, McKoy JF, Moriwaki H, Weinstein IB. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J Exp Ther Oncol.* 2005;5(1):69-78.
- 217.Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene.* 2003 Feb 20;22(7):1035-44.
- 218.Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappaB and induction of apoptosis. *Oncogene.* 0000 //print;23(14):2507-22.

219. Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8715-22.
220. Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2005 Feb 10;113(4):660-9.
221. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Feb;308(2):767-73.
222. Neuhaus T, Pabst S, Stier S, Weber AA, Schror K, Sachinidis A, et al. Inhibition of the vascular-endothelial growth factor-induced intracellular signaling and mitogenesis of human endothelial cells by epigallocatechin-3 gallate. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 12;483(2-3):223-7.
223. Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, et al. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 15;10(14):4865-73.
224. Buszewski B, Kawka S, Suprynowicz Z, Wolski T. Simultaneous isolation of Rutin and Esculin from plant material and drugs using solid-phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 1993 Mar;11(3):211-5.
225. Erlund I, Kosonen T, Alftan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000 Nov;56(8):545-53.
226. Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2013 Dec 12;150(3):805-17.
227. Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol.* 2002 Jun 20;446(1-3):187-94.
228. Chen M, Song F, Guo M, Liu Z, Liu S. Analysis of flavonoid constituents from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(4):264-71.
229. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 1997 Jun 2;409(1):12-6.
230. Yang Y, Zhang F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrason Sonochem.* 2008 Apr;15(4):308-13.
231. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000 Nov;55(6):481-504.
232. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 2012 Apr 15;197(1):40-6.
233. Picot D, Garavito RM. Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. *FEBS Lett.* 1994 Jun 6;346(1):21-5.
234. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol.* 1984 May 1;33(9):1525-30.
235. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol.* 2001 Sep;56(9):683-7.
236. Han Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology.* 2009 2//;9(2):207-11.
237. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002 Sep;76(3):560-8.
238. Stanley Mainzen Prince P, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006;20(2):96-102.
239. Hu QH, Wang C, Li JM, Zhang DM, Kong LD. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Oct;297(4):F1080-91.
240. Hao HH, Shao ZM, Tang DQ, Lu Q, Chen X, Yin XX, et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Life Sci.* 2012 Nov 2;91(19-20):959-67.

241. Asgary S, Naderi G, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafie M, et al. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm Acta Helv.* 1999 Feb;73(5):223-6.
242. Gulpinar O, Halililoglu AH, Gokce MI, Gogus C, Baltaci S. The value of perioperative mitomycin C instillation in improving subsequent bacillus calmette-guerin instillation efficacy in intermediate and high-risk patients with non-muscle invasive bladder cancer: a prospective randomized study. *Int Braz J Urol.* 2012 Jul-Aug;38(4):474-9.
243. Ushida Y, Matsui T, Tanaka M, Matsumoto K, Hosoyama H, Mitomi A, et al. Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta. *J Nutr Biochem.* 2008 Oct;19(10):700-7.
244. Lee W, Ku S-K, Bae J-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology.* 2012 9//;50(9):3048-55.
245. Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, et al. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci.* 2007 Aug;104(4):329-34.
246. Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-Fed rats because of its low digestibility. *J Nutr.* 1997 Jul;127(7):1395-400.
247. Zeng H, Wang Y, Kong J, Nie C, Yuan Y. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants. *Talanta.* 2010 Dec 15;83(2):582-90.
248. Milde J, Elstner EF, Grassmann J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine.* 2004 Feb;11(2-3):105-13.
249. Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA.* 1996 Feb 14;275(6):447-51.
250. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009 Oct;61(10):1365-74.
251. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 1995 Mar 31;235(2):207-19.
252. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 1991 Jul;12(7):1193-6.
253. Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett.* 1996 Dec 3;109(1-2):185-91.
254. van der Logt EM, Roelofs HM, Nagengast FM, Peters WH. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis.* 2003 Oct;24(10):1651-6.
255. Cantero G, Campanella C, Mateos S, Cortes F. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis.* 2006 Sep;21(5):321-5.
256. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(1):19-21.
257. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(2):91-8.
258. Maridonneau-Parini I, Braquet P, Garay RP. Heterogeneous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells. *Pharmacol Res Commun.* 1986 Jan;18(1):61-72.
259. Kumar MS, Unnikrishnan MK, Patra S, Murthy K, Srinivasan KK. Naringin and naringenin inhibit nitrite-induced methemoglobin formation. *Pharmazie.* 2003 Aug;58(8):564-6.
260. Zielinska-Przyjemska M, Ignatowicz E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophil apoptosis and oxidative metabolism. *Phytother Res.* 2008 Dec;22(12):1557-62.
261. Jagetia GC, Reddy TK, Venkatesha VA, Kedlaya R. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta.* 2004 Sep;347(1-2):189-97.
262. Kim SW, Kim CE, Kim MH. Flavonoids inhibit high glucose-induced up-regulation of ICAM-1 via the p38 MAPK pathway in human vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Dec 2;415(4):602-7.
263. Chen J, Guo R, Yan H, Tian L, You Q, Li S, et al. Naringin inhibits ROS-activated MAPK pathway in high glucose-induced injuries in H9c2 cardiac cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Apr;114(4):293-304.

264. Lu YH, Su MY, Huang HY, Lin L, Yuan CG. Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Neurosci Lett*. 2010 Oct 22;484(1):6-11.
265. Benkovic V, Knezevic AH, Dikic D, Lisicic D, Orsolcic N, Basic I, et al. Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009 Jun;60(2):129-38.
266. Liu Y, Su WW, Wang S, Li PB. Naringin inhibits chemokine production in an LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell line. *Mol Med Rep*. 2012 Dec;6(6):1343-50.
267. Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J Food Sci*. 2010 Sep;75(7):H212-7.
268. Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem*. 2003 Apr;246(1-2):193-6.
269. Balestrieri ML, Castaldo D, Balestrieri C, Quagliuolo L, Giovane A, Servillo L. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *J Lipid Res*. 2003 Feb;44(2):380-7.
270. Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*. 2003 Dec 19;74(5):603-12.
271. Saponara S, Testai L, Iozzi D, Martinotti E, Martelli A, Chericoni S, et al. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca(2+)-activated K+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2006 Dec;149(8):1013-21.
272. Yow TT, Pera E, Absalom N, Heblinski M, Johnston GA, Hanrahan JR, et al. Naringin directly activates inwardly rectifying potassium channels at an overlapping binding site to tertiapin-Q. *Br J Pharmacol*. 2011 Jul;163(5):1017-33.
273. Huang H, Wu K, You Q, Huang R, Li S, Wu K. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):396-402.
274. Rajadurai M, Prince PS. Preventive effect of naringin on cardiac mitochondrial enzymes during isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: a transmission electron microscopic study. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(6):354-61.
275. Rani N, Bharti S, Manchanda M, Nag TC, Ray R, Chauhan SS, et al. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion. *PLoS One*. 2013;8(12):e82577.
276. Froufe HJ, Abreu RM, Ferreira IC. Using molecular docking to investigate the anti-breast cancer activity of low molecular weight compounds present on wild mushrooms. *SAR QSAR Environ Res*. 2011 Jun;22(3):315-28.
277. Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J Nutr*. 2006 Jun;136(6):1477-82.
278. Ramesh E, Alshatwi AA. Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:97-105.
279. Kawaguchi K, Kikuchi S, Hasegawa H, Maruyama H, Morita H, Kumazawa Y. Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-release and liver injury in mice by naringin. *European Journal of Pharmacology*. 1999 3/5;/368(2-3):245-50.
280. Miller EG, Peacock JJ, Bourland TC, Taylor SE, Wright JM, Patil BS, et al. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr Cancer*. 2008;60(1):69-74.
281. Greinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC, et al. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 1;40(20):10263-73.
282. Kanno S-i, Shouji A, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, et al. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sciences*. 2006 1/11;/78(7):673-81.
283. Camargo CA, Gomes-Marcondes MC, Wutzki NC, Aoyama H. Naringin inhibits tumor growth and reduces interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in rats with Walker 256 carcinosarcoma. *Anticancer Res*. 2012 Jan;32(1):129-33.
284. Chang J, Rimando A, Pallas M, Camins A, Porquet D, Reeves J, et al. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2012 9//;33(9):2062-71.
285. Sanders TH, McMichael RW, Jr., Hendrix KW. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem*. 2000 Apr;48(4):1243-6.

286. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002 May 22;50(11):3337-40.
287. Sobolev VS, Cole RJ. trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem*. 1999 Apr;47(4):1435-9.
288. Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, van Breemen RB. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem*. 2002 Jan 30;50(3):431-5.
289. Lyons MM, Yu C, Toma RB, Cho SY, Reiboldt W, Lee J, et al. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J Agric Food Chem*. 2003 Sep 24;51(20):5867-70.
290. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):493-506.
291. Buiarelli F, Coccioli F, Jasionowska R, Merolle M, Terracciano A. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(18):2955-64.
292. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
293. de Lange DW. From red wine to polyphenols and back: a journey through the history of the French Paradox. *Thromb Res*. 2007;119(4):403-6.
294. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
295. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*. 1997;11(5):287-313.
296. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):255-60.
297. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3621-30.
298. Gill C, Walsh SE, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Resveratrol sensitizes androgen independent prostate cancer cells to death-receptor mediated apoptosis through multiple mechanisms. *Prostate*. 2007 Nov 1;67(15):1641-53.
299. Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*. 2007 Sep 01;12:4839-54.
300. Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SX, Zhou H, Hei TK. Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res*. 2008 Mar 10;314(5):1163-76.
301. Ishibashi M, Ohtsuki T. Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Med Res Rev*. 2008 Sep;28(5):688-714.
302. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 1981 Jun;66(6):1191-308.
303. Rezk YA, Balulad SS, Keller RS, Bennett JA. Use of resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 May;194(5):e23-6.
304. Johnson GE, Ivanov VN, Hei TK. Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis*. 2008 Jun;13(6):790-802.
305. Leone S, Fiore M, Lauro MG, Pino S, Cornetta T, Cozzi R. Resveratrol and X rays affect gap junction intercellular communications in human glioblastoma cells. *Mol Carcinog*. 2008 Aug;47(8):587-98.
306. Reagan-Shaw S, Mukhtar H, Ahmad N. Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochem Photobiol*. 2008 Mar-Apr;84(2):415-21.
307. Scarlatti F, Sala G, Ricci C, Maioli C, Milani F, Minella M, et al. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Lett*. 2007 Aug 8;253(1):124-30.
308. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013 5//;35(3):473-85.
309. Shahrzad S, Bitsch I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1996 Aug 16;741(2):223-31.

310. Ockels FS, Eyles A, McPherson BA, Wood DL, Bonello P. Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. *J Chem Ecol.* 2007 Sep;33(9):1721-32.
311. Golumbic C, Mattill HA. The antioxidant properties of gallic acid and allied compounds. *Oil & Soap.* 1942;19(8):144-5.
312. Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem.* 2002 Jun 19;50(13):3713-7.
313. Kroes BH, van den Berg AJ, Quarles van Ufford HC, van Dijk H, Labadie RP. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* 1992 Dec;58(6):499-504.
314. Gichner T, Pospisil F, Veleminsky J, Volkeova V, Volke J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiol (Praha).* 1987;32(1):55-62.
315. Mirvish SS, Cardesa A, Wallcave L, Shubik P. Induction of mouse lung adenomas by amines or ureas plus nitrite and by N-nitroso compounds: effect of ascorbate, gallic acid, thiocyanate, and caffeine. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Sep;55(3):633-6.
316. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 1995 Nov;18(11):1526-30.
317. Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry.* 2002 11//;79(3):307-13.
318. Aruoma A, Murcia J, Halliwell b. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J Agric Food Chem.* 1993 November 41(11):1880-5
319. Giftson Senapathy J, Jayanthi S, Viswanathan P, Umadevi P, Nalini N. Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats--a chemopreventive approach. *Food Chem Toxicol.* 2011 Apr;49(4):887-92.
320. Vijaya Padma V, Sowmya P, Arun Felix T, Baskaran R, Poornima P. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food Chem Toxicol.* 2011 Apr;49(4):991-8.
321. Chia YC, Rajbanshi R, Calhoun C, Chiu RH. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules.* 2010 Nov 16;15(11):8377-89.
322. Gomes CA, da Cruz TG, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MP. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem.* 2003 Dec 4;46(25):5395-401.
323. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000 Nov 23;408(6811):433-9.
324. Elford HL, Freese M, Passamani E, Morris HP. Ribonucleotide reductase and cell proliferation. I. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor growth rate in a series of rat hepatomas. *J Biol Chem.* 1970 Oct 25;245(20):5228-33.
325. Takeda E, Weber G. Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program. *Life Sci.* 1981 Mar 2;28(9):1007-14.
326. Tihan T, Elford HL, Cory JG. Studies on the mechanisms of inhibition of L1210 cell growth by 3,4-dihydroxybenzohydroxamic acid and 3,4-dihydroxybenzamidoxime. *Adv Enzyme Regul.* 1991;31:71-83.
327. McGinty A, Chang YW, Sorokin A, Bokemeyer D, Dunn MJ. Cyclooxygenase-2 expression inhibits trophic withdrawal apoptosis in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):12095-101.
328. Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 2001 Dec 28;276(52):48997-9002.
329. Chandramohan Reddy T, Bharat Reddy D, Aparna A, Arunasree KM, Gupta G, Achari C, et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-kappaB inactivation. *Toxicol In Vitro.* 2012 Apr;26(3):396-405.
330. Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol.* 1995 Jun;163(3):555-60.
331. Schnelldorfer T, Gansauge S, Gansauge F, Schlosser S, Beger HG, Nussler AK. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer.* 2000 Oct 1;89(7):1440-7.
332. Sakagami H, Satoh K. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res.* 1997 Jan-Feb;17(1A):221-4.

333. Strlic M, Radovic T, Kolar J, Pihlar B. Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct 23;50(22):6313-7.
334. Chen HM, Wu YC, Chia YC, Chang FR, Hsu HK, Hsieh YC, et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 2009 Dec 28;286(2):161-71.
335. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespon C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Feb 1;350(1):49-54.
336. Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol*. 1998 Jun 15;55(12):1973-81.
337. Hsu CL, Huang SL, Yen GC. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2006 Jun 14;54(12):4191-7.
338. Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1997;20:245-67.
339. You BR, Park WH. The enhancement of propyl gallate-induced HeLa cell death by MAPK inhibitors is accompanied by increasing ROS levels. *Mol Biol Rep*. 2011 Apr;38(4):2349-58.
340. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.
341. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
342. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
343. Cao L, Kim S, Xiao C, Wang RH, Coumoul X, Wang X, et al. ATM-Chk2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency. *EMBO J*. 2006 May 17;25(10):2167-77.
344. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
345. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-90.
346. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
347. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):16986-92.
348. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6020-4.
349. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):247-56.
350. Hseu YC, Chen SC, Lin WH, Hung DZ, Lin MK, Kuo YH, et al. *Toona sinensis* (leaf extracts) inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in vascular endothelial cells. *J Ethnopharmacol*. 2011 Mar 8;134(1):111-21.
351. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*. 1991 Feb;57(1):1-7.
352. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*. 1980;16(3):259-65.
353. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin--studies with [³H]curcumin. *Toxicology*. 1981;22(4):337-44.
354. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1978 Aug;43(2):86-92.
355. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*. 1978 Dec;8(12):761-8.
356. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*. 1999 Apr;27(4):486-94.
357. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol*. 1973 Jun;25(6):447-52.
358. Sato RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1986 Dec;24(12):651-4.

- 359.Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* 1985 Nov;29(2):197-202.
- 360.Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol.* 1976 Aug 1;25(15):1811-2.
- 361.Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1985 Apr;33(4):1725-8.
- 362.Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound Repair Regen.* 1999 Sep-Oct;7(5):362-74.
- 363.Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem.* 1999 Oct;47(10):4297-300.
- 364.Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science.* 2004 Apr 23;304(5670):600-2.
- 365.Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 15;88(12):5292-6.
- 366.Liu JY, Lin SJ, Lin JK. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis.* 1993 May;14(5):857-61.
- 367.Reddy S, Aggarwal BB. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* 1994 Mar 14;341(1):19-22.
- 368.Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:1-75.
- 369.Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):363-98.
- 370.Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol.* 1994 Dec;46(12):1013-6.
371. Singh SV, Hu X, Srivastava SK, Singh M, Xia H, Orchard JL, et al. Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. *Carcinogenesis.* 1998 Aug;19(8):1357-60.
- 372.Deshpande SS, Ingle AD, Maru GB. Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. *Cancer Lett.* 1997 Sep 16;118(1):79-85.
- 373.Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr Cancer.* 1992;17(1):77-83.
- 374.Mohandas KM, Desai DC. Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel. *Indian J Gastroenterol.* 1999 Jul-Sep;18(3):118-21.
- 375.Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol.* 1996 Aug 23;52(4):519-25.
- 376.Simon A, Allais DP, Duroux JL, Basly JP, Durand-Fontanier S, Delage C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Lett.* 1998 Jul 3;129(1):111-6.
- 377.Robinson TP, Ehlers T, Hubbard IR, Bai X, Arbiser JL, Goldsmith DJ, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: aromatic enone and dienone analogues of curcumin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 Jan 6;13(1):115-7.
- 378.Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* 1995 Jul 20;94(1):79-83.
- 379.Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, et al. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res.* 1999 Feb 1;59(3):597-601.
- 380.Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol.* 1995 May 26;49(11):1551-6.
- 381.Surh YJ, Han SS, Keum YS, Seo HJ, Lee SS. Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF-kappaB and AP-1. *Biofactors.* 2000;12(1-4):107-12.
- 382.Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
- 383.Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol.* 2006;6(2):111-30.

- 384.Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62.
- 385.Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002 Jun;16(6):1053-68.
- 386.Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol.* 1999 Sep 15;163(6):3474-83.
- 387.Thresiamma KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res.* 1998 Dec;17(4):431-4.
- 388.Shukla Y, Arora A, Taneja P. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutat Res.* 2002 Mar 25;515(1-2):197-202.
- 389.Oda Y. Inhibitory effect of curcumin on SOS functions induced by UV irradiation. *Mutat Res.* 1995 Oct;348(2):67-73.
- 390.Thapliyal R, Maru GB. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2001 Jun;39(6):541-7.
- 391.Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Jan;92(1):33-8.
- 392.Boedefeld WM, 2nd, Bland KI, Heslin MJ. Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2003 Oct;10(8):839-51.
- 393.Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate.* 2001 Jun 1;47(4):293-303.
- 394.Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene.* 2001 Nov 15;20(52):7597-609.
- 395.Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, et al. Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2003 Jan;2(1):95-103.
- 396.Choudhuri T, Pal S, Aggarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett.* 2002 Feb 13;512(1-3):334-40.
- 397.Bush JA, Cheung KJ, Jr., Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res.* 2001 Dec 10;271(2):305-14.
- 398.Zhang F, Altorki NK, Mestre JR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1999 Mar;20(3):445-51.
- 399.Chen HW, Huang HC. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1998 Jul;124(6):1029-40.
- 400.Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis.* 2004 Sep;25(9):1671-9.
- 401.Hall M, Gourley C, McNeish I, Ledermann J, Gore M, Jayson G, et al. Targeted anti-vascular therapies for ovarian cancer: current evidence. *Br J Cancer.* 2013 Feb 5;108(2):250-8.
- 402.Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57.
- 403.Weir NM, Selvendiran K, Kutala VK, Tong L, Vishwanath S, Rajaram M, et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. *Cancer Biol Ther.* 2007 Feb;6(2):178-84.
- 404.Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design.* 2009 //;15(7):777-91.
- 405.Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Jun;42(3):317-25.
- 406.Rosenberg B. Cisplatin: current status and new developments. 1980.
- 407.Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998 Sep;34(10):1522-34.

- 408.Olszewski U, Hamilton G. A Better Platinum-Based Anticancer Drug Yet to Come? Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents). 2010 //;10(4):293-301.
- 409.Zhang J, Wang L, Xing Z, Liu D, Sun J, Li X, et al. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 May;10(4):272-82.
- 410.Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol.* 2009 Feb;5(1):33-42.
- 411.Gunes DA, Florea AM, Splettstoesser F, Busselberg D. Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity. *Neurotoxicology.* 2009 Mar;30(2):194-202.
- 412.Florea AM, Busselberg D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals.* 2006 Aug;19(4):419-27.
413. Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf.* 2009;32(12):1109-22.
- 414.Knoll C, Smith RJ, Shores C, Blatt J. Hearing genes and cisplatin deafness: a pilot study. *Laryngoscope.* 2006 Jan;116(1):72-4.
- 415.Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJ, et al. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 20;24(6):918-24.
- 416.Drottar M, Liberman MC, Ratan RR, Roberson DW. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate protects against cisplatin-induced hearing loss in guinea pigs. *Laryngoscope.* 2006 Feb;116(2):292-6.
- 417.Momekov G, Ferdinandov D, Bakalova A, Zaharieva M, Konstantinov S, Karaivanova M. In vitro toxicological evaluation of a dinuclear platinum(II) complex with acetate ligands. *Arch Toxicol.* 2006 Sep;80(9):555-60.
- 418.Liu M, Chien CC, Burne-Taney M, Molls RR, Racusen LC, Colvin RB, et al. A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Mar;17(3):765-74.
- 419.Masubuchi Y, Kawasaki M, Horie T. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes associated with cisplatin-induced acute renal failure in male rats. *Arch Toxicol.* 2006 Jun;80(6):347-53.
- 420.Keller GA, Di Girolamo G. Prokinetic agents and QT prolongation: a familiar scene with new actors. *Curr Drug Saf.* 2010 Jan;5(1):73-8.
- 421.Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 Feb 27;532(3):290-3.
- 422.Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Moreno-Sanchez R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med.* 2010 Feb;31(1):29-59.
- 423.Basu S, Ma R, Boyle PJ, Mikulla B, Bradley M, Smith B, et al. Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cis -platin, Tamoxifen, Melphalan, Betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 ganglioside. *Glycoconj J.* 2004;20(9):563-77.
- 424.Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol.* 2010 Apr;40(4):347-59.
- 425.Che CM, Siu FM. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. *Curr Opin Chem Biol.* 2010 Apr;14(2):255-61.
- 426.Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005 May;5(3):251-65.
- 427.Wang ZH, Miao XP, Tan W, Zhang XR, Xu BH, Lin DX. [Single nucleotide polymorphisms in XRCC1 and clinical response to platin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer]. *Ai Zheng.* 2004 Aug;23(8):865-8.
- 428.Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Jan;53(1):3-11.
- 429.Schar P, Fasi M, Jessberger R. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(13):3921-9.
- 430.Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat.* 2005 Jun;8(3):131-46.

431. Benedetti M, Ducani C, Migoni D, Antonucci D, Vecchio VM, Ciccarese A, et al. Experimental evidence that a DNA polymerase can incorporate N7-platinated guanines to give platinated DNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(3):507-10.
432. Coluccia M, Natile G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007 Jan;7(1):111-23.
433. Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Nov;59(11):1914-27.
434. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div.* 2008 Oct 03;3:14.
435. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1664-72.
436. Nurse P, Masui Y, Hartwell L. Understanding the cell cycle. *Nat Med.* 1998 Oct;4(10):1103-6.
437. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science.* 1994 Feb 25;263(5150):1143-5.
438. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest.* 1999 Dec;104(12):1645-53.
439. Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ.* 1994 Sep;5(9):983-93.
440. O'Connor PM, Ferris DK, Hoffmann I, Jackman J, Draetta G, Kohn KW. Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 27;91(20):9480-4.
441. Morgan SE, Kastan MB. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res.* 1997;71:1-25.
442. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):68-76.
443. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Aug;57(8-9):1229-35.
444. Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2155-68.
445. Yazlovitskaya EM, DeHaan RD, Persons DL. Prolonged wild-type p53 protein accumulation and cisplatin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 18;283(4):732-7.
446. Pestell KE, Hobbs SM, Titley JC, Kelland LR, Walton MI. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol.* 2000 Mar;57(3):503-11.
447. Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol.* 1999 Sep;10(9):1011-21.
448. Valkov NI, Sullivan DM. Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resist Updat.* 2003 Feb;6(1):27-39.
449. O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat.* 2003 Dec;6(6):313-22.
450. Rubbi CP, Milner J. p53--guardian of a genome's guardian? *Cell Cycle.* 2003 Jan-Feb;2(1):20-1.
451. Kasparkova J, Pospisilova S, Brabec V. Different recognition of DNA modified by aatitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer by tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19):16064-9.
452. Clarke PA, Pestell KE, Di Stefano F, Workman P, Walton MI. Characterisation of molecular events following cisplatin treatment of two curable ovarian cancer models: contrasting role for p53 induction and apoptosis in vivo. *Br J Cancer.* 2004 Oct 18;91(8):1614-23.
453. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ.* 2003 Jul;10(7):808-22.
454. Einhorn LH. Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4592-5.
455. Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'Incalci M, et al. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia.* 2001 Jan-Feb;3(1):10-6.
456. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(13):4129-39.
457. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):2764-72.
458. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):12710-7.
459. Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Matsushashi S, Yoshimura T, Hisatomi A, et al. Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer.* 2002 Aug 15;95(4):896-906.

460. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):35778-85.
461. Dent P, Grant S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin Cancer Res*. 2001 Apr;7(4):775-83.
462. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15;275(50):39435-43.
463. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol*. 2002 Apr 15;63(8):1423-30.
464. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst*. 1990 May 2;82(9):749-55.
465. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol*. 1990 Nov 15;40(10):2353-62.
466. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells*. 1990 Aug-Sep;2(8-9):275-80.
467. Fan Z, Baselga J, Masui H, Mendelsohn J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res*. 1993 Oct 1;53(19):4637-42.
468. Hancock MC, Langton BC, Chan T, Toy P, Monahan JJ, Mischak RP, et al. A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. *Cancer Res*. 1991 Sep 1;51(17):4575-80.
469. Hofmann J, Doppler W, Jakob A, Maly K, Posch L, Uberall F, et al. Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C. *Int J Cancer*. 1988 Sep 15;42(3):382-8.
470. Grunicke HH. The cell membrane as a target for cancer chemotherapy. *Eur J Cancer*. 1991;27(3):281-4.
471. Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol*. 1996 May 1;6(5):606-13.
472. Saleem A, Yuan ZM, Taneja N, Rubin E, Kufe DW, Kharbanda SM. Activation of serine/threonine protein kinases and early growth response 1 gene expression by tumor necrosis factor in human myeloid leukemia cells. *J Immunol*. 1995 Apr 15;154(8):4150-6.
473. Nehme A, Baskaran R, Aebi S, Fink D, Nebel S, Cenni B, et al. Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res*. 1997 Aug 1;57(15):3253-7.
474. Potapova O, Haghighi A, Bost F, Liu C, Birrer MJ, Gjerset R, et al. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J Biol Chem*. 1997 May 30;272(22):14041-4.
475. Pumiglia KM, Decker SJ. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):448-52.
476. Ormerod MG, O'Neill C, Robertson D, Kelland LR, Harrap KR. cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;37(5):463-71.
477. Turchi JJ, Patrick SM, Henkels KM. Mechanism of DNA-dependent protein kinase inhibition by cis-diamminedichloroplatinum(II)-damaged DNA. *Biochemistry*. 1997 Jun 17;36(24):7586-93.
478. Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC. High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann Intern Med*. 1984 Jan;100(1):19-24.
479. Schilder RJ, Ozols RF. New therapies for ovarian cancer. *Cancer Invest*. 1992;10(4):307-15.
480. Hills CA, Kelland LR, Abel G, Siracky J, Wilson AP, Harrap KR. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration in vitro against four platinum complexes. *Br J Cancer*. 1989 Apr;59(4):527-34.
481. Kelland LR, Kimbell R, Hardcastle A, Aherne GW, Jackman AL. Relationships between resistance to cisplatin and antifolates in sensitive and resistant tumour cell lines. *Eur J Cancer*. 1995 Jun;31A(6):981-6.

- 482.Hagopian GS, Mills GB, Khokhar AR, Bast RC, Jr., Siddik ZH. Expression of p53 in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: modulation with the novel platinum analogue (1R, 2R-diaminocyclohexane)(trans-diacetato)(dichloro)-platinum(IV). *Clin Cancer Res.* 1999 Mar;5(3):655-63.
- 483.Fraval HN, Roberts JJ. Excision repair of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced damage to DNA of Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 1979 May;39(5):1793-7.
- 484.Richon VM, Schulte N, Eastman A. Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells. *Cancer Res.* 1987 Apr 15;47(8):2056-61.
485. Teicher BA, Holden SA, Kelley MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, et al. Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 1987 Jan 15;47(2):388-93.
- 486.Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7265-79.
- 487.Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer.* 2000;37(1):1-18.
- 488.Brody T, Shane B. *Handbook of vitamins: University of California.*
- 489.Labriola D, Livingston R. Possible interactions between dietary antioxidants and chemotherapy. *Oncology (Williston Park).* 1999 Jul;13(7):1003-8; discussion 8, 11-2.
- 490.Agus DB, Cordon-Cardo C, Fox W, Drobnjak M, Koff A, Golde DW, et al. Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Nov 3;91(21):1869-76.
- 491.Gottlieb N. Cancer treatment and vitamin C: the debate lingers. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Dec 15;91(24):2073-5.
- 492.Leeb BF, Witzmann G, Ogris E, Studnicka-Benke A, Andel I, Schweitzer H, et al. Folic acid and cyanocobalamin levels in serum and erythrocytes during low-dose methotrexate therapy of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 1995 Jul-Aug;13(4):459-63.
- 493.Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH, Austin JS, Veitch TA, Lee JY, et al. Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1994 Dec 1;121(11):833-41.
- 494.Hunt PG, Rose CD, McIlvain-Simpson G, Tejani S. The effects of daily intake of folic acid on the efficacy of methotrexate therapy in children with juvenile rheumatoid arthritis. A controlled study. *J Rheumatol.* 1997 Nov;24(11):2230-2.
- 495.Recchia F, Lelli S, Di Matteo G, Rea S, Frati L. [5-fluorouracil, cisplatin and retinol palmitate in the management of advanced cancer of the oral cavity. Phase II study]. *Clin Ter.* 1993 May;142(5):403-9.
- 496.Israel I, Hajji O, Grefft-Alami A. Vitamin A augmentation of the effects of chemotherapy in the metastatic breast cancers after menopause. Randomized trial in 100 patients. *Ann Med Internc.* 1985;7(136):551-4.
- 497.Mills EE. The modifying effect of beta-carotene on radiation and chemotherapy induced oral mucositis. *Br J Cancer.* 1988 Apr;57(4):416-7.
- 498.Odin AP. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat Res.* 1997 Mar;386(1):39-67.
- 499.Otero P, Viana M, Herrera E, Bonet B. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radic Res.* 1997 Dec;27(6):619-26.
- 500.Rao M, Kumar MM, Rao MA. In vitro and in vivo effects of phenolic antioxidants against cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Biochem.* 1999 Feb;125(2):383-90.
- 501.De Martinis BS, Bianchi MDLP. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacological Research.* 2001 2001/10/01;44(4):317-20.
- 502.Cooke MS, Evans MD, Podmore ID, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, et al. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Lett.* 1998 Nov 20;439(3):363-7.
- 503.Appenroth D, Frob S, Kersten L, Splinter FK, Winnefeld K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. *Arch Toxicol.* 1997;71(11):677-83.
- 504.Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CK. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol.* 2008 Sep;60(6):521-7.

- 505.Sica G, Iacopino F, Robustelli della Cuna G, Marchetti P, Marini L. Combined effects of estradiol, leuprorelin, tamoxifen and medroxyprogesterone acetate on cell growth and steroid hormone receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994;120(10):605-9.
- 506.Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Ferrandina G, et al. Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994;34(6):459-64.
- 507.M. C. Bone and soft tissue tumors. Springer- Verlag Wien New York2003 ISBN 3-211-83235-1(2nd Edition).
- 508.Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 1970 Jul 11;227(5254):168-70.
- 509.Vartholomatos G, Alexiou GA, Batistatou A, Lykoudis E, Voulgaris S, Kyritsis AP. Rapid cell cycle analysis for intraoperative diagnosis of brain tumors. *Brain Tumor Pathol*. 2015 Apr;32(2):151-2.
- 510.Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol*. 1997 Jan 24;53(2):121-33.
- 511.Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1998 Aug;38(6):421-64.
- 512.Santamaria L, Bianchi-Santamaria A, dell'Orti M. Carotenoids in cancer, mastalgia, and AIDS: prevention and treatment--an overview. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1996;15(2-4):89-95.
- 513.Lopez I, Goudou C, Ribrag V, Sauvage C, Hazebroucq G, Dreyfus F. [Treatment of mucositis with vitamin E during administration of neutropenic antineoplastic agents]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1994;145(6):405-8.
- 514.Wood LA. Possible prevention of adriamycin-induced alopecia by tocopherol. *N Engl J Med*. 1985 Apr 18;312(16):1060.
- 515.Zheng SY, Li Y, Jiang D, Zhao J, Ge JF. Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549. *Mol Med Rep*. 2012 Mar;5(3):822-6.
- 516.Sugantha Priya E, Selvakumar K, Bavithra S, Elumalai P, Arunkumar R, Raja Singh P, et al. Anti-cancer activity of quercetin in neuroblastoma: an in vitro approach. *Neurol Sci*. 2014 Feb;35(2):163-70.
- 517.Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2424-8.
- 518.Kang TB, Liang NC. Effect of quercetin on activities of protein kinase C and tyrosine protein kinase from HL-60 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1997 Jul;18(4):374-6.
- 519.Hwang J-T, Ha J, Park I-J, Lee S-K, Baik HW, Kim YM, et al. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters*. 2007 3/8;247(1):115-21.
- 520.Huh SW, Bae SM, Kim Y-W, Lee JM, Namkoong SE, Lee IP, et al. Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology*. 2004 9//;94(3):760-8.
- 521.Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 15;32(4):314-8.
- 522.Faried A, Kurnia D, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, et al. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2007 Mar;30(3):605-13.
- 523.Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol*. 2010 Sep 1;641(2-3):102-7.
- 524.You BR, Moon HJ, Han YH, Park WH. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2010 5//;48(5):1334-40.
- 525.Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2002 Mar;8(3):893-903.
- 526.Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med*. 1997 Dec;130(6):576-84.
- 527.Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Nov 15;1317(2):95-100.
528. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr;4(4):307-20.
- 529.Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1993 Dec;15(3):191-219.
- 530.Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007 Aug;334(2):115-24.

531. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, De Castro J, Espinosa E, Redondo A, et al. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control*. 2004 Sep;15(7):707-19.
532. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 Mar 10;160(1):1-40.
533. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*. 2006 Nov;26(6):747-66.
534. Cipak L, Rauko P, Miadokova E, Cipakova I, Novotny L. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leuk Res*. 2003 Jan;27(1):65-72.
535. Wang Y, Han A, Chen E, Singh RK, Chichester CO, Moore RG, et al. The cranberry flavonoids PAC DP-9 and quercetin aglycone induce cytotoxicity and cell cycle arrest and increase cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2015 May;46(5):1924-34.
536. Demiroglu-Zergeroglu A, Basara-Cigerim B, Kilic E, Yanikkaya-Demirel G. The investigation of effects of quercetin and its combination with Cisplatin on malignant mesothelioma cells in vitro. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:851589.
537. Miodini P, Fioravanti L, Fronzo GD, Cappelletti V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *British Journal of Cancer*. 1999 08/11/received 01/12/revised 01/12/accepted;80(8):1150-5.
538. Larocca LM, Teofili L, Leone G, Sica S, Pierelli L, Menichella G, et al. Antiproliferative activity of quercetin on normal bone marrow and leukaemic progenitors. *Br J Haematol*. 1991 Dec;79(4):562-6.
539. Notarbartolo M, Poma P, Perri D, Dusonchet L, Cervello M, D'Alessandro N. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Lett*. 2005 Jun 16;224(1):53-65.
540. Howells LM, Mitra A, Manson MM. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *Int J Cancer*. 2007 Jul 1;121(1):175-83.
541. Chan MM, Soprano KJ, Weinstein K, Fong D. Epigallocatechin-3-gallate delivers hydrogen peroxide to induce death of ovarian cancer cells and enhances their cisplatin susceptibility. *J Cell Physiol*. 2006 May;207(2):389-96.
542. Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene*. 1998 Apr 30;16(17):2243-8.
543. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*. 1994 Aug 26;78(4):539-42.
544. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Piersiak T, Glowniak K, Gawron A, Kandefers-Szarszen M. The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 May 1;69(9):1343-50.
545. Loughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Robin J, Houlst S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*. 1989 1989/09/01;38(17):2859-65.
546. Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec;27(11-12):1313-23.
547. Levine AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997 2/7;88(3):323-31.
548. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):293-9.
549. Kuhar M, Imran S, Singh N. Celecoxib Enhances the Chemotherapeutic Response of Cisplatin and TNF-alpha in SiHa Cells through Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathway. *Int J Biomed Sci*. 2007 Sep;3(3):176-84.
550. Montopoli M, Ragazzi E, Froidi G, Caparrotta L. Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by curcumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cell Prolif*. 2009 Apr;42(2):195-206.
551. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1765-73.
552. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4647-62.

553. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4663-74.
554. Braguini WL, Cadena SM, Carnieri EG, Rocha ME, de Oliveira MB. Effects of deltamethrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. *Toxicol Lett*. 2004 Sep 25;152(3):191-202.
555. Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Feb;280(2):638-49.
556. Antunes LM, Francescato HD, Darin JD, de Lourdes PBM. Effects of selenium pretreatment on cisplatin-induced chromosome aberrations in wistar rats. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2000;20(6):341-8.
557. Kuhad A, Pilkhwai S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem*. 2007 Dec 12;55(25):10150-5.
558. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1998 1998/06/01;131(6):518-26.
559. Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl*. 1997;27:26-34.
560. Shih CA, Lin JK. Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine formation by curcumin in mouse fibroblast cells. *Carcinogenesis*. 1993 Apr;14(4):709-12.
561. Υ. S. Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων συστατικών διατροφικών προϊόντων. 2003;Διδακτορική Διατριβή.
562. Palipoch S, Punsawad C. Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by Cisplatin. *J Toxicol Pathol*. 2013 Sep;26(3):293-9.
563. Joy J, Nair CK. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity in Swiss albino mice by *Rubia cordifolia* extract. *J Cancer Res Ther*. 2008 Jul-Sep;4(3):111-5.
564. Waseem M, Parvez S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: modulatory role of curcumin. *Food Chem Toxicol*. 2013 Mar;53:334-42.
565. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod*. 2009 Jul;24(7):1717-25.
566. ΚΑΛΛΙΣΤΡΑΤΟΣ Γ, ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Α, ΔΟΝΟΣ Α, ΦΑΣΣΚΕ Ε. ΔΙΑΣΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ. *MATERIA MEDICA GRECA*. 12(3):213-27.
567. Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Res*. 1979 Mar;39(3):663-81.

